

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U. N° 7

Action de quelques Antiseptiques
et de la Lysocithine sur la Morphologie
et la Cytologie du Streptocoque

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1938

PAR

Jean PASCAL

Pharmacien

Moniteur aux Travaux pratiques de Microbiologie
de la Faculté de Pharmacie de Paris

JURY { MM. LUTZ, *Président.*
MASCRE, *Professeur.*
BACH, *Maître de Conférences.*

PARIS

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1938

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série . N°

Action de quelques Antiseptiques
et de la Lysocithine sur la Morphologie
et la Cytologie du Streptocoque

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1938

PAR

Jean PASCAL

Pharmacien

Moniteur aux Travaux pratiques de Microbiologie
de la Faculté de Pharmacie de Paris

JURY { MM. LUTZ, *Président.*
MASCRÉ, *Professeur.*
BACH, *Maître de Conférences.*

PARIS

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1938

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. P. GUÉRIN, *Doyen*, O. ✱, ☉ I.
P. LEBEAU, *Assesseur*, O. ✱, ☉ I. Membre de l'Institut.
P. DESPORT, *Secrétaire*, ✱, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, O. ✱, ☉ I.	Botanique générale.
LEBEAU, O. ✱, ☉ I, Membre de l'Institut.	Pharmacie chimique.
GORIS, O. ✱, ☉ I.	Pharmacie galénique.
DAMIENS, ✱, ☉ I.	Chimie minérale.
HERISSEY, O. ✱, ☉ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ☉ I.	Chimie organique.
LUTZ, ✱, ☉ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ☉ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.	Zoologie.
DELABY, ✱, ☉ I.	Chimie analytique.
PICON, ☉ I.	Physique.
MASCRE, ☉ I.	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✱, ☉ I.

Professeurs honoraires :

MM. BÉHAL, G. O. ✱, ☉ I, et DÉLÉPINE, O. ✱, ☉ I, Membres de l'Institut.
GUERBET, ✱, ☉ I, PERROT, C. ✱, ☉ I., COUTIÈRE, O. ✱, ☉ I.,
BOUGAULT, O. ✱, ☉ I. et TASSILLY, O. ✱, ☉ I.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. BACH, ☉ I.	Microbiologie.
FLEURY, ☉ I.	Hydrologie et Hygiène.
BEDEL, ☉ I.	Minéralogie et Législation et Déontologie pharmaceutiques.
REGNIER, ☉ I.	Parasitologie.
CHARONNAT, ☉ I.	Chimie et Pharmacie Chimique.
JANOT	Pharmacie galénique et biologie végétale.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, travaux pratiques de 1 ^{re} année.	Chimie générale et pharmaceutique.
GAUTIER, travaux pratiques de 2 ^e et 3 ^e années.	Chimie analytique.
GUHLOT, travaux pratiques de 4 ^e année.	Chimie biologique et Pharmacie chimique.
PARIS.	Micrographie.
X.	Physique.
DEVAL, ✱, ☉ I.	Microbiologie.

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, ☉ A.



A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. LUTZ

Professeur de Cryptogamie-Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie

A qui j'adresse l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon respectueux dévouement pour l'intérêt constant qu'il a bien voulu porter à mon travail.

À MONSIEUR E. ROUSSEAU

Ancien Assistant à la Faculté de Pharmacie
Ancien chef de Laboratoire et Chargé de cours
à l'Ecole de Puériculture de la Faculté de Médecine de Paris

Dont les conseils et les recherches en cours, sur l'action de la Lysocithine dans le cancer, ont été à l'origine d'une partie de mon travail.

Qu'il veuille bien trouver ici l'hommage de ma respectueuse gratitude.

A MON PÈRE

Mon premier Maître en Pharmacie.

A MA MÈRE

Dont la sollicitude a permis l'achèvement de mes études et la réalisation de cette thèse.

Témoignage d'affectueuse et profonde gratitude.

A MA FEMME

A MES ENFANTS

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

Action de quelques Antiseptiques et de la Lysocithine sur la Morphologie et la Cytologie du Streptocoque

INTRODUCTION

Aux premiers temps de la Bactériologie, on considéra la forme des germes comme immuable. Ils devaient trouver place, sans conteste, dans l'une des classes suivantes : *Microcoques*, *Bactéries*, *Bacilles*, *Vibrions*, *Spirilles* ou *Spirochètes*. Peu à peu, cependant, on découvrit des variations morphologiques spontanées chez un même microbe, puis on s'ingénia à les provoquer. Il fut vite établi que certaines doses d'antiseptiques judicieusement choisies, et plus généralement certaines conditions de vie bien déterminées, amenaient presque automatiquement des changements de forme chez les Bactéries. Il suffisait d'atteindre une zone dysgénésique où la cellule, ayant de la difficulté à vivre et à se multiplier, se met en équilibre avec le milieu extérieur et, ce faisant, modifie son aspect.

La plupart des travaux effectués dans ce sens mettent surtout en évidence des variations de formes bacillaires en formes plus courtes, ou filamenteuses, ou spiralées. Rarement on s'est attaché à obtenir des

formes nouvelles à partir des cocci. Notre travail complètera une partie de cette lacune.

Parmi les variations morphologiques observées chez le *Streptocoque*, les formes géantes ont retenu tout spécialement notre attention. En les soumettant à l'influence de la Lysocithine, nous avons obtenu des résultats qui contribueront — c'est du moins notre espérance — à l'étude cytologique des Bactéries.

* * *

Aux premières pages de ce travail, nous tenons à exprimer à M. le Professeur Lutz nos sentiments de respectueuse gratitude pour la confiance qu'il nous a toujours témoignée : en nous inspirant le sujet de cette thèse, en nous prodiguant ses conseils, en acceptant la présidence de notre Jury, en nous désignant enfin pour un poste de Moniteur aux Travaux pratiques de Microbiologie.

Nous sommes particulièrement heureux de pouvoir présenter nos remerciements respectueux à M. E. Rousseau pour les innombrables et précieux conseils dont il a bien voulu nous faire bénéficier, principalement en ce qui concerne nos recherches sur l'action de la Lysocithine, dont il fut l'inspirateur.

Que M. le Professeur Mascré trouve ici l'expression de nos sentiments respectueux et reconnaissants pour nous avoir guidé au cours de nos études et pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'être membre de notre Jury.

Nous adressons à M. le Professeur agrégé Bach, chargé du cours de Microbiologie, qui a bien voulu faire partie de notre Jury, l'expression de notre profonde gratitude et de notre respectueux dévouement.

PLAN DU TRAVAIL

CHAPITRE I

Historique de la variabilité en Bactériologie.
Formes anormales du Streptocoque provoquées ou observées directement chez les malades.
Phénomènes d'accoutumance.
Cytologie bactérienne.

CHAPITRE II

Action de quelques antiseptiques sur la morphologie du Streptocoque.
Description des formes obtenues.

CHAPITRE III

Action de la Lysocithine sur le Streptocoque hypertrophié ou normal.

CHAPITRE IV

Considérations personnelles sur la cytologie du corps microbien.

Conclusions générales.

Index bibliographique.

CHAPITRE I

Historique de la Variabilité en Bactériologie

Au moment où la Bactériologie entra dans sa phase active, il était naturel que la morphologie des éléments nouveaux attirât particulièrement l'attention des chercheurs. On s'empressa, d'abord, de classer les Bactéries d'après leur forme.

En 1872, Cohn [16] décrit six groupes nettement délimités, constants dans leur forme, sans transition possible entre eux ; ce sont les genres : *Micrococcus*, *Bacterium*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Spirillum* et *Spirochæta*.

En 1881, Koch [40] se montre également partisan de la stabilité des espèces.

Mais cette théorie du monomorphisme est trop stricte, et, bientôt, les critiques s'élèvent.

Billroth [7] en 1874, Ray Lankaster [68] en 1876, Cienkowski [14] en 1877, signalent des variations morphologiques chez un même microbe.

La réaction va beaucoup plus loin avec Naegeli [62] en 1882, qui se fait le champion d'un polymorphisme

poussé à l'extrême : Microcoques, Bacilles, Spirilles, Vibrions, etc..., ne seraient autres que les stades d'évolution d'un organisme pléomorphe au plus haut degré. Naegeli admet qu'une Bactérie transportée dans le lait y engendre l'acide lactique, dans la viande la pourriture, et dans le corps humain une maladie quelconque. Il y aurait donc des variations de forme et de fonction conditionnées par le milieu. Le microbe pourrait ainsi prendre tous les aspects connus, du Microcoque au Spirille.

En 1889, Metchnikoff [56] s'avère également partisan du polymorphisme.

En réalité, la juste thèse semble avoir été soutenue par Zopf [86] en 1883, qui adopte l'idée fondamentale de Cohn, mais s'élève contre une délimitation trop rigide des genres, et il émet, à côté d'une théorie du développement compliqué des germes, une autre théorie de la variabilité suivant le milieu, fait déjà signalé par Naegeli.

La même année, Pasteur écrit : « Les travaux de mon laboratoire ont établi que les virus ne sont pas des entités morbides, qu'ils peuvent affecter des formes et des propriétés physiologiques multiples dépendant des milieux où ces virus vivent et se multiplient ».

Depuis cette époque, on s'est efforcé de provoquer des variations morphologiques chez les Bactéries, en les faisant vivre dans des milieux peu favorables. Mais avant d'aborder ce long chapitre, il convient de

noter le polymorphisme correspondant aux stades successifs du cycle évolutif normal des germes.

De nombreux auteurs ont étudié ce cas particulier.

Lasseur et ses élèves : Minoux [59] en 1927, Rolin [73] en 1929, Marchal [52] en 1932.

En 1919, Clark et Ruehl [15] qui examinent la morphologie bactérienne aux diverses phases de la multiplication, constatent des différences de forme très importantes entre les organismes âgés et les organismes jeunes.

En 1931, Mme Kaplan [37], après A. T. Henrici [33] en 1925, dont nous citerons la préface :

« La croissance des Bactéries en culture est gouvernée par les mêmes lois qui régissent le développement d'un organisme multicellulaire ; les cellules bactériennes, au cours de la croissance, subissent exactement le même développement cyclique que les cellules d'une plante ou d'un animal présentant une forme embryonnaire durant la période de croissance rapide, une forme mûre ou différenciée, durant la période de croissance ralentie ou de repos, et une forme sénile durant la période de mort. En un mot, nous pouvons parler d'une « cytomorphose » dans les populations d'organismes libres unicellulaires, différant seulement en degré de celle des individus pluricellulaires. »

ACTION DES AGENTS CHIMIQUES.

Cette part étant faite aux variations normales, en milieu favorable, passons en revue les principaux tra-

vaux concernant les variations morphologiques provoquées par les agents chimiques.

En 1875, Bucholtz [12] écrit : « Je n'affirme rien, mais il est permis de supposer que les Bactéries provenant de terrains différents peuvent montrer des degrés différents de résistance vis-à-vis d'un même antiseptique ».

En 1881, Jalan de Lacroix [35] juge de la valeur d'un antiseptique par la dose qu'il suffit d'ajouter à un ballon de bouillon exposé à l'air pour le préserver de l'envahissement par les Bactéries. Il fait un ballon témoin sans antiseptique.

La nullité de cette expérience est évidente.

En 1883, Duclaux [24] attire l'attention sur la nature du liquide nutritif, sur la réaction acide ou alcaline, sur l'influence de la température et déclare :

« On doit tenir compte dans une expérience de ce genre, de la communauté d'origine et de traitement des cultures qui servent au semis... » et il ajoute : « l'identité des semences ne suffit pas à assurer l'identité des colonies, il faut encore l'identité absolue du milieu et des conditions extérieures ».

Ainsi, peu à peu, se dégagent les principes qui vont permettre des recherches sérieuses.

INFLUENCE DU pH.

Abordons en premier lieu, l'action spéciale de la réaction du milieu de culture, du pH.

En 1911, Lasseur [48] note l'influence des bases

sur l'allongement et des acides sur le raccourcissement des Bactéries.

Vincent pense que les changements d'aspect du Streptocoque sont en relation avec la réaction des milieux de culture.

En 1936, D. Blanchard [8] obtient des formes bacillaires du Streptocoque et du Staphylocoque, en faisant varier le pH dans le sens acide ou le sens alcalin.

Tirons enfin des conclusions de Rolin les affirmations suivantes : « Sous l'action de différents agents chimiques, en particulier de la concentration en ions H_+ , les Bactéries peuvent prendre des aspects différents de ceux qu'elles offrent dans les milieux naturels ou même dans les cultures. »

Et encore : « La concentration en ions H_+ exerce sur les variations des formes des microbes une action analogue à celle des substances dites « antiseptiques ».

ACTION DES ANTISEPTIQUES.

Les premiers, Guignard et Charrin [29] en 1887, mettent en évidence des variations morphologiques considérables du *Bacille pyocyane* cultivé en présence d'acide phénique, créosote, acide salicylique, naphthol β , thymol, alcool, bichromate de potasse, acide borique. Ils obtiennent des formes sphériques, filamenteuses ou spiralées, mais notent le retour à la forme normale après cinq ou six jours.

En 1901, Pakes [64] signale l'effet des hauts pour-

centages de nitrates sur la morphologie du *Bacille typhique* qui s'allonge à la concentration de 1 % et prend la forme ovoïde des cellules levures à 6 %.

En 1903, Thiercelin et Jouhaud [80] font prendre à volonté à l'*Entérocoque* les formes streptococcique, tétraédrique, staphylococcique et bacillaire en modifiant les conditions de culture ; en particulier, ils obtiennent les formes bacillaires en présence d'alcool, sulfate de quinine, permanganate de potasse, acide chromique, bichromate de potasse.

En 1906, Péju et Rajat [66] soumettent le *Bacille typhique* à l'influence de nombreux iodures, de quelques autres sels et de l'urée. Ils notent des formes filamenteuses. Ils classent les produits chimiques en raison de leur action sur la morphologie bactérienne et, renouvelant leurs expériences avec le *Colibacille*, lui reconnaissent une plus grande résistance en milieu salin.

Pour ces auteurs, les cocci ne sont pas modifiables par l'urée.

Wilson [85], en 1907, provoque la formation de filaments à partir du *B. pyocyannique*, du *B. coli* et du *B. typhique*, soumis à l'action de l'urée.

L'urée encore est utilisée par Sartory et Nonotte [76], en 1908 ; ils observent des formes grêles du *B. anthracis*.

Lasseur étudiant le *B. Le Monnieri*, obtient avec l'acide phénique des éléments très courts et avec l'acide borique des allongements ; il note aussi des

formes filamenteuses du *B. chlororaphis* sous l'influence de l'ammoniaque.

En 1912, Baerthlein [5] signale des formes atypiques du *Vibron cholérique*, entre autres, maintenu longtemps sur un milieu artificiel. Cet auteur parle même de constance indéniable transmissible aux générations ultérieures.

En 1915, H. Coupin [17] étudie l'action de la sur-salure sur les Bactéries marines ; il observe pour les bacilles un accroissement de longueur, des formes filamenteuses, et, pour les spirilles, un retard marqué dans le développement.

Kufferath [46], en 1920, note une disposition particulière en 8 allongé dû à l'étranglement du bâtonnet dans des cultures de *Colibacille* effectuées sur gélose lactosée minéralisée. Les Bactéries ainsi modifiées, une fois transportées en eau peptonée normale, retrouvent rapidement leur forme habituelle. Avec les Coccacées, l'auteur n'observe pas de variations morphologiques aussi importantes ; il y a conservation de la forme coccus, mais les éléments sont beaucoup plus petits.

En 1925, Palgen [65] fait agir sur des Bactéries sporogènes (*B. subtilis* et *B. mesentericus*) des doses croissantes de sulfate de magnésie ; il observe un raccourcissement des éléments et en conclut à une augmentation de l'énergie de division.

En 1930, P. Bordet [10] démontre que la privation de calcium détermine chez certains bacilles des modifications morphologiques considérables en les trans-

formant en éléments courts, le plus souvent en coccobacilles. Remis au contact du calcium, les microbes reprennent aussitôt leurs caractères normaux.

En 1936, enfin, D. Blanchard soumet du *Staphylocoque* et du *Streptocoque* à l'action de divers antiseptiques : fluorure d'argent, chlorure de sodium, bichromate de potasse, asparagine, alcool ; elle constate, suivant les cas, des allongements ou des formes géantes.

Ce dernier travail contredit une des conclusions de Minoux : « Les Coccacées peuvent prendre des formes dites géantes, les autres Bactéries des formes allongées ou raccourcies. » Nous aurons l'occasion personnellement de prouver, à maintes reprises, que les Coccacées peuvent aussi s'allonger.

ACTION DES AGENTS PHYSIQUES.

Parmi les agents physiques, le plus souvent utilisé pour provoquer des variations morphologiques chez les Bactéries est la chaleur.

En 1908, Arloing [4] obtient des formes géantes ramifiées, renflées, allongées, étirées, granuleuses du *Bacille tuberculeux* par une température de 44°-45° et une augmentation de pression (2 atmosphères 5).

Boquet et Nègre [9] signalent, en 1919, les variations du *Cryptocoque de Rivolta*, corps ovoïde, qui se présente comme tel ou sphérique à 36° et en filaments très allongés à 15°-18°.

Rolin, en 1929, étudie l'action de la température

39°-40° sur le *B. chlororaphis* et note la production de formes filamenteuses après dix jours d'étuve ; il conclut que l'élévation de température paraît augmenter l'énergie de croissance, l'énergie de division restant la même.

En 1936, D. Blanchard observe de 40° à 45° des formes géantes et parfois bacillaires du *Staphylocoque*.

Divers auteurs ont cherché quelle pouvait être la réaction des Bactéries aux rayons ultra-violets.

Mme Victor Henri [32], en 1914, par des irradiations ménagées, provoque chez la *Bactéridie charbonneuse* des modifications morphologiques et biochimiques : bâtonnets très courts, ou diplocoques, ou cocci isolés, ou filaments grêles. L'auteur croit à une stabilité des nouveaux caractères par de nombreux repiquages successifs.

Formes anormales du Streptocoque observées directement sur les malades et dans les hémocultures.

Au cours de cette large revue des variations morphologiques subies par les Bactéries sous l'influence d'agents très divers, nous avons rarement vu mentionner les cocci en général, le *Streptocoque* en particulier.

Nous avons même noté à plusieurs reprises, que les Coccacées étaient plutôt considérées comme réfractaires à une action déformante des antiseptiques.

Il en va tout autrement si l'on considère les nom-

breuses communications qui ont été faites au sujet des formes anormales du *Streptocoque* isolé de malades.

En 1913, Dante de Blasi [19] signale un aspect curieux d'un *Streptocoque* qu'il a eu l'occasion d'isoler d'une urine. Cet auteur a observé une forme lancéolée mais qui tendait à reprendre son aspect sphérique.

En 1918, L. Kroskowska et R. Nitsch [44] observent à partir d'un malade suspect d'angine diphtérique des formes variées du *Streptocoque* en culture sur sérum coagulé : formes longues et formes sphériques qui, réensemencées en bouillon donnent une culture en chaînettes et, par repiquage sur gélose-ascite et sérum coagulé, un retour aux formes allongées.

En 1920, Krongold-Vinaver [43] signale des formes anormales qu'il considère comme des formes de résistance.

En 1922, Y. Kermorgant [38] décrit des formes bacillaires et coccobacillaires dans des hémocultures, au cours d'une septicémie à *Streptocoque* et dans deux cas d'endocardites infectieuses. « Il semble que le milieu sang joue un grand rôle dans la production de ces formes », déclare l'auteur, qui signale encore des formes géantes au cours d'érysipèles développés sur des néoplasmes cutanés ; d'autre part, il reproduit artificiellement ces variations morphologiques en utilisant des macérations de viandes âgées additionnées de peptones dégradées et d'acides aminés.

En 1930, Ach. Urbain [81] pratique des hémocul-

tures chez des chevaux en état d'hyperthermie et atteints de pneumonie gourmeuse ou d'affections typhoïdes. Le *Streptocoque* gourmeux se présente alors sous formes bacillaires groupées en paquets d'épingles et reprenant, par repiquages, la forme en chaînette.

En 1931, P. Millischer et Chaillot [58] trouvent, au cours d'une angine, à l'examen direct, des bacilles Gram positif, rassemblés en paquets d'épingles, comme le *B. diphtérique*. Par réensemencement en milieu approprié, ce germe se transforme en *Streptocoque* typique.

Enfin, au cours de ces dernières années, quelques auteurs se sont attachés à l'étude de la forme filtrante du *Streptocoque* : Hauduroy et Lesbré, Ramsine, Rosenow, Nativelle [63] en 1937. Ce dernier signale en outre, un aspect bacillaire, semblable au *B. subtilis*, à partir d'une hémoculture dans un cas de septicémie. Citons, à titre documentaire, sa conclusion : « La phase virulente, infectante proprement dite, correspondrait au passage du stade invisible au stade visible du microbe. C'est vraisemblablement sous cette forme que l'infection se propage à un organisme. »

Nous avons insisté sur ces variations morphologiques du *Streptocoque*, observées directement de sujets malades, parce qu'elles présentent une analogie frappante avec celles que nous avons provoquées artificiellement.

C'est pour nous l'occasion de remercier respectueusement M. le Dr Lévy-Brühl, chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur, qui a bien voulu nous communi-

quer des préparations de *Streptocoques* géants et bacillaires, isolés par culture ou hémoculture de malades atteints soit d'abcès, soit d'endocardite.

Phénomènes d'accoutumance.

Le fait de déterminer, à volonté, par des agents chimiques ou physiques des modifications morphologiques chez les Bactéries, a conduit tout naturellement les chercheurs à s'occuper du problème de l'accoutumance.

Un élève de Duclaux, Kossiakoff [42], en 1887, donne cette conclusion à ses travaux : « 1^o les organismes inférieurs soumis à l'action d'un antiseptique à des doses graduellement croissantes, acquièrent la faculté de vivre et de se développer dans des solutions de cet antiseptique qui, agissant sur des organismes non acclimatés, en empêcheraient le développement.

« 2^o La force de résistance aux antiseptiques en général, ainsi que la faculté d'accommodation, sont différents dans divers organismes. »

De son côté, Wasserzug [84], l'année suivante, déclare : « Quand une forme est une fois acquise dans un milieu donné, elle arrivera à s'y fixer d'une façon permanente et, quand on modifie le milieu, la forme ne varie pas ou très peu. Le retour à la forme fixe est d'autant plus rapide que l'action du milieu primitif a été plus prolongée. Toutefois, à mesure que l'influence du milieu nouveau se prolonge à son tour, le changement morphologique s'accroît davantage et

se transmet de générations en générations jusqu'au moment où le retour à la forme antérieure ne peut plus s'effectuer ».

En 1910, Marks [53] note l'accoutumance à l'arsenic des Bactéries du *Choléra des poules*.

En 1912, Regenstein [70] faisant agir soit de l'acide phénique soit du sublimé sur le *B. typhique* et le *Colibacille*, montre que ces microbes arrivent à supporter des doses une fois et demie plus fortes que la dose normale.

Köhne [41], en 1914, signale l'accoutumance des Bactéries du *Rouget* et du *Charbon* à des doses 2 fois plus fortes de salvarsan et le *Pneumocoque*, 3 fois plus fortes d'éthylcupréine que celles qu'ils peuvent supporter normalement.

En 1915, Ch. Richet [70 bis] prouve aussi l'accoutumance des ferments lactiques vis-à-vis de divers antiseptiques.

En 1923, Jungeblut [36] affirme avoir fait supporter aux *B. typhique*, *B. cholérique*, *Streptocoque*, *Staphylocoque* et *Pneumocoque*, 5, 10, 50 fois plus de sublimé, trypaflavine, rivanol et bleu de méthylène que ne le comportent les doses infertilisantes ou mortelles.

Pour M. Lesbros [50], en 1927, l'accoutumance est un fait. Il y a une dose limite pour chaque microbe et pour chaque toxique. L'accoutumance est spécifique.

On ne saurait mieux faire, pour donner une vue d'ensemble sur la question de l'accoutumance, que

de citer les conclusions de L. Masson [54], en 1910, qui fixe définitivement ce que Kossiakoff et ses autres prédécesseurs avaient entrevu :

« 1° Les Bactéries soumises à l'action des doses croissantes d'un antiseptique, peuvent acquérir la faculté de supporter des doses qui sont infertilisantes pour ces mêmes Bactéries non acclimatées.

« 2° L'accoutumance des Bactéries aux antiseptiques n'atteint son degré le plus élevé qu'en procédant par étapes dans lesquelles les doses infertilisantes d'antiseptique sont toujours précédées de doses d'abord plus faibles puis progressivement croissantes.

« 3° Les étapes successives de l'accoutumance aux antiseptiques ne présentent pas une ascension régulière jusqu'au point maximum de résistance : il existe une phase d'adaptation moyenne pendant laquelle la Bactérie offre une sensibilité égale ou même inférieure à celle des phases antérieures.

« 4° Le degré maximum de l'accoutumance aux antiseptiques est toujours suivi d'une régression de la propriété acquise, l'accoutumance est un phénomène temporaire.

« 5° La régression de la propriété d'accoutumance aux antiseptiques tend vers le retour à la résistance normale de l'espèce ; elle s'accompagne souvent d'un état de sensibilité plus grande probablement temporaire.

« 6° Les modifications morphologiques imprimées à la Bactérie pendant son accoutumance aux anti-

septiques sont aussi temporaires et correspondent à la phase d'adaptation. Elles disparaissent quand la Bactérie a atteint son maximum de résistance. Il existe ainsi un certain parallélisme entre la morphologie du microbe et l'une de ses propriétés biologiques, la résistance vitale aux agents chimiques.

« 7° Le caractère temporaire de l'adaptation des Bactéries aux antiseptiques et des modifications de forme qui en sont la conséquence, fournissent un exemple de la résistance de l'espèce à la variation ».

L'accoutumance est donc un fait, si l'on maintient les Bactéries en présence d'un antiseptique, mais le retour à la forme normale, par réensemencement sur milieu ordinaire, est aussi un fait bien acquis. Ce retour s'effectue plus ou moins vite suivant l'intensité et le temps d'action de l'excitation.

Il ne peut donc être question, ici, d'acquisition définitive des caractères nouveaux par les générations futures. Les variations sont temporaires.

FORMES DE LA VARIABILITÉ.

De nombreux auteurs se sont efforcés de définir les diverses formes de la variabilité, c'est-à-dire tout changement morphologique ou physiologique d'un microorganisme qui se différencie plus ou moins du type normal.

Rodet [72], en 1874 ; Clifford Dobell [22], en 1912 ; Gotschlich [26], en 1927 ; Rippel [71], en 1929 ; W. B. Brierley [11], la même année ; enfin Mar-

chal [52], en 1932, que nous citerons spécialement. Pour cet auteur il y a :

« 1^o Des modifications passagères, accommodats ou somations, qui disparaissent avec l'action qui les a suscitées ;

« 2^o Des modifications de durée, variations à retentissement prolongé ou « Dauermodifikationen » qui survivent durant quelque temps à l'action modificatrice ;

« 3^o Des mutations qui, dans leur spontanéité, fixent définitivement un caractère n'existant pas dans les aptitudes du germe envisagé. Elles correspondent aux modifications durables de certains auteurs. »

Faut-il conclure de l'étude de toutes ces variations que la notion d'espèce perd le sens qu'on lui attribue généralement ?

Avec Guignard [28], nous pensons qu'il n'en est rien. « Pour obscure qu'elle se montre parfois, la notion de l'espèce chez les Bactéries peut donc être dégagée sans trop de peine à travers les variations multiples de la forme et de la fonction » car « ce qu'il faut envisager c'est la constance du développement, abstraction faite des variations individuelles peu importantes. »

Nous donnerons, en dernier lieu, l'avis de Flugge [25], en 1896. « En réalité, toutes les modifications morphologiques ne conduisent pas à la confusion des espèces, au contraire, elles servent, avec des moyens d'observation plus parfaits, à mieux les caractériser. »

Cytologie bactérienne.

Depuis longtemps, la structure intime du corps bactérien fait l'objet d'âpres controverses. En particulier, la question la plus débattue est celle du noyau.

Y a-t-il un noyau ? S'il existe, sous quelle forme ?

Rares sont les auteurs qui nient la présence d'un noyau chez les Bactéries : Alexeieff [1], en 1921, Lazlo Wamoscher [83], en 1930. Cet auteur opère par manipulation des Bactéries (groupe typhique) et leur fait subir une série d'opérations (piqûre, pression, écrasement, allongement, section) ; il conclut que l'existence du noyau est très peu vraisemblable car la section de la cellule bactérienne entraîne toujours la mort quel que soit le siège de cette section.

La plupart des auteurs, au contraire, affirment la présence du noyau, mais s'affrontent en deux tendances distinctes. Citons d'abord les partisans d'un noyau vrai, central, et, parmi ceux-ci :

Rayman et Kruis [69], en 1903, par coloration à l'hématoxyline ferrique du *B. mycoïdes*, mettent en évidence un noyau sous forme d'un granule très coloré au milieu de chaque cellule.

F. Vejdowsky [82], en 1904.

Arthur Meyer [57], en 1908, obtient dans la spore du *B. pastorianus*, un petit granule fortement coloré, entouré d'une zone hyaline : le noyau central.

En 1910, E. Mencl [55], après coloration vitale au bleu polychrome affirme l'existence d'un granule

disposé au centre de chaque cellule et qu'il a considéré comme le noyau.

En 1912, Douglas et Distaso [23] étudient une Bactérie isolée de crachats et de muco-pus ; ils la fixent à l'acide osmique et la colorent au Giemsa : le noyau apparaît très nettement dans tous ses détails.

Kruis [45], en 1913, utilise, non plus les colorants, mais la lumière ultra-violette pour laquelle la substance nucléaire est opaque ; il suffit alors de photographier les Bactéries vivantes à un fort grossissement.

Nello Mori [60], en 1913, colore au Giemsa diverses Bactéries (*B. Coli*, *B. pyocyanique*...) et remarque que la différenciation des noyaux se fait mieux sur un milieu renfermant de la peptone, du maltose ou de la mannite.

En 1923, Nadson et Perfiliev [61], utilisent soit la coloration vitale au bleu de méthylène, soit l'héματοxyline ferrique ; ils constatent un corps central : le noyau.

Enfin, en 1925, il faut citer Gustein [31] qui, lui aussi, met en évidence dans les Bactéries un gros granule chromatique qu'il considère comme le noyau.

A cette théorie du noyau typique, central, s'opposent ceux qui croient à un noyau diffus.

Mentionnons tout d'abord Babès, Ernst Büschli, Spengler, Much, Schaudinn.

Pour Swellengrebel [77], en 1908, il existe dans les Bactéries une spirale chromatique de nature nucléaire.

Guilliermond [30], en 1910, considère, de même, les Bactéries comme des organismes dépourvus de véritable noyau et ne renfermant que des granules chromatiques disséminés dans le cytoplasme (noyau diffus) en une sorte de filament chromatique axial (noyau rudimentaire).

En 1908, Amato [2] fait des colorations vitales au brillant kresylblau du *B. subtilis*, *B. mycoides*, *Spirillum volutans* ; il pense que le granule central qui existe dans la spore et dans les cellules très jeunes correspond à un noyau qui se résoudrait ensuite en un système chromidial.

Cl. Dobell [22], en 1911, émet une théorie satisfaisante pour toutes les opinions. Après avoir coloré de nombreux Spirilles et Bactéries au Giemsa et à l'hématoxyline ferrique, il déclare :

« Les Bactéries sont des organismes pourvus d'un noyau qui peut prendre, suivant les cas, l'aspect d'un filament axial, d'un réticulum chromatique ou se dissocier en un système chromidial. Le noyau ne peut être défini qu'au point de vue morphologique. Si l'on se trouve en présence d'une Bactérie qui n'offre pas de noyau, mais dont le protoplasme renferme de nombreux grains colorables, on ne pourra affirmer que ces derniers représentent un noyau diffus, c'est-à-dire un équivalent du noyau que lorsqu'on aura observé un stade du développement où ces grains s'assemblent en un corps morphologique comparable à un noyau. »

En 1921-1922, Kirchenstein [39], après avoir décrit

des méthodes de coloration spéciales, déclare que « les formations granulaires découvertes dans le plasma des individus de toutes les espèces bactériennes, doivent être considérées comme le noyau ou comme des particules morphologiques possédant les propriétés de la matière nucléaire » et il ajoute : « Quand un *Micrococcus* offre un seul grain central, on peut admettre que ce grain est un noyau, les corpuscules polaires de la plupart des espèces constituent deux noyaux, la spirale chromatique de certaines espèces est un noyau spiriforme. » Enfin, considérant le cas spécial des variations morphologiques, Kirchenstein affirme : « Les formes atypiques renferment tous les éléments constitutifs des formes normales. La localisation des granules nucléaires et de la substance nucléaire proprement dite rappelle, à tous égards, celle des formes normales au même stade de division. »

A. M. da Cunha et Julio Muniz [18], en 1928, mettent en évidence, par la réaction de Feulgen, des grains colorés de façon intense. Cela correspondrait à des grains de chromatine renfermant de l'acide thymonucléinique.

En 1933, H. Petter a observé dans une *Sarcine* géante un corpuscule central, unique, qui présente les caractères d'un noyau donnant une réaction de Feulgen positive ; dans les Bactéries (*B. mycoides*, *B. megatherium*), la réaction s'est montrée diffuse avec électivité dans l'ébauche des spores, fait qui confirme les résultats obtenus par un grand nombre d'auteurs et

qui amène à penser que les Bactéries possèdent, en général, une chromatine diffuse.

En 1934, A. Ch. Hollande [34] colore les Bactéries par les éosinates de soude de bleu de méthylène ou par l'hématoxyline ferrique, après action de fixateurs spéciaux. L'auteur constate dans le cytoplasme dense et homogène entouré d'une fine membrane, l'existence, au nombre de un ou plusieurs par cellule, de nucléosomes, de paranucléosomes et de métanucléosomes ; il émet trois hypothèses, mais ne conclut pas :

- 1^o le nucléosome (qui se présente sous forme d'un granule sphérique très petit) serait, à lui seul, le noyau de la cellule bactérienne ;
- 2^o le nucléosome serait le centrosome ;
- 3^o le nucléosome ne pourrait être comparé ni à un noyau ni à un centrosome, les Bactéries ayant une structure spéciale dans laquelle il n'y aurait pas de disjonction en noyau et en cytoplasme.

Pour être complet, après les nombreux partisans du noyau typique et du noyau diffus, il convient de citer V. Ruzicka [75], en 1904 et A. Ambroz [3], en 1909, pour qui les Bactéries ne renferment pas de véritable noyau, ni de corps central. Ils considèrent les Bactéries comme des organismes réduits à l'état de noyaux, sortes de noyaux libres.

Enfin, mentionnons la récente théorie de L. Lindgren [51], en 1935, qui affirme que les Bactéries renferment des gènes et non un noyau diffus.

CHAPITRE II

Action de quelques antiseptiques sur la morphologie du Streptocoque.

GÉNÉRALITÉS.

Aucune idée préconçue ne nous a guidé dans le choix des antiseptiques employés, étant persuadé que presque tous les produits chimiques peuvent avoir une influence sur la morphologie des microbes. Nous nous sommes seulement attaché à n'utiliser que des corps solubles dans l'eau, car les autres solvants, l'alcool par exemple, sont susceptibles d'agir par eux-mêmes, compliquant ainsi l'interprétation des résultats.

Nous avons, d'autre part, choisi le *Streptocoque* comme sujet d'expérience, parce que les cocci, en général, ont été peu utilisés dans les recherches sur les variations morphologiques.

Le problème à résoudre consistait à provoquer chez le *Streptocoque* des modifications de forme en changeant ses conditions de vie, et, en particulier, en ajoutant au milieu de culture des substances antisept-

tiques à des concentrations telles que la zone dysgénésique soit atteinte. L'équilibre s'établit alors entre le corps microbien et le milieu extérieur et les formes anormales apparaissent.

Tout se ramène donc à une question de doses. Il faut d'abord, pour chaque produit, déterminer la dose inhibitrice, puis se cantonner dans la zone qui la précède immédiatement.

Nous envisagerons successivement : 1° le milieu nutritif ; 2° les Streptocoques employés ; 3° les solutions d'antiseptiques ; 4° une technique spéciale pour l'anaérobiose ; 5° la température de culture ; 6° la solution colorante ; 7° l'action particulière de chaque antiseptique sur la morphologie du Streptocoque : A, en aérobiose, avec ou sans glycérine ; B, en anaérobiose, avec ou sans glycérine ; 8° les considérations générales sur l'ensemble des expériences.

1° Le milieu nutritif.

a) COMPOSITION. — C'est un bouillon synthétique renfermant :

Glucose pur anhydre.....	1 gr.
Peptone bactériologique spéciale Byla.....	20 gr.
Glycérine pure à 30°.....	50 gr.
Eau distillée q. s. p.....	1.000 cm ³

La peptone employée est une peptone pancréatique de viande de bœuf ; elle est d'une couleur blanc jaunâtre, de saveur amère, complètement soluble dans l'eau froide.

Le milieu sans glycérine a la même composition, les 50 gr. de glycérine étant remplacés par de l'eau distillée.

Le bouillon est d'abord chauffé à 125° pendant vingt minutes, filtré et réparti en tubes de 10 cm³. La stérilisation est faite à 120° pendant vingt minutes.

b) RÉACTION. — L'alcalinisation du milieu est obtenue par addition de soude au 1/3. Le pH est de 7,8 par la méthode colorimétrique (échelle au bleu de bromothymol de Clark) ; il suffit d'ajouter à 10 cm³ de bouillon, X gouttes de l'indicateur. L'usage du comparateur est nécessaire car le bouillon est ambré et tend à donner, avec le bleu, des teintes verdâtres. Mesuré électrométriquement, par la méthode des piles de concentrations de Nernst (avec un système à électrode au calomel d'Ostwald), le pH du bouillon, avec ou sans glycérine, s'établit également à 7,8.

2° Les Streptocoques employés.

Ce sont des Streptocoques isolés de pus d'abcès et réensemencés sur bouillon. Leur culture se fait parfaitement sur le milieu glycérimé ou non. Cependant, dans ce dernier cas, les cocci paraissent un peu plus gros. Sur gélose, ils donnent les colonies classiques « en gouttes de rosée ». La gélatine n'est pas liquéfiée.

Les passages sur bouillon ont été effectués quoti-

diennement. Nous n'avons ainsi employé que des cultures jeunes. Les expériences faites avec des *Streptocoques* fraîchement isolés ont d'ailleurs donné les mêmes résultats que celles où des germes, depuis longtemps réensemencés, avaient été employés.

Pour pratiquer les ensemencements, nous avons adopté la pipette Pasteur qui permet d'opérer avec une goutte de bouillon cultivé, c'est-à-dire sur une quantité relativement importante de germes, toutes les précautions de stérilité étant prises.

3^o Les solutions d'antiseptiques.

Nous avons préparé nos solutions dans des ballons jaugés de 50 cm³. Théoriquement, le seul moyen d'avoir une solution stérile serait, après dissolution du produit, de passer le tout à l'autoclave. En pratique, cette technique est irréalisable car la plupart des antiseptiques employés sont plus ou moins altérés par la chaleur. Aussi avons-nous opéré de la façon suivante : on stérilise à 120°, pendant vingt minutes, les ballons de 50 cm³ remplis aux 3/4 d'eau distillée. L'antiseptique est pesé et introduit dans le ballon. On complète à 50 cm³ avec de l'eau distillée stérile. La forte concentration de l'antiseptique assure la parfaite stérilité de la solution. La solution antiseptique est ajoutée dans les tubes de bouillon, aux doses choisies, avec une pipette de 1 cm³, graduée en dixièmes, stérile.

Le calcul des dilutions est très simple, les tubes contenant 10 cm³ de bouillon.

4^o Technique spéciale pour l'anaérobiose.

Par suite de la nécessité d'assurer une répartition homogène de l'antiseptique dans le bouillon, nous nous sommes arrêté à la technique suivante : les tubes de bouillon sont portés, pendant dix minutes, à l'autoclave à 110°, pour chasser l'air dissous, puis refroidis rapidement pour éviter sa redissolution. On ajoute alors la solution antiseptique et, aussitôt après, on coule dans chaque tube une couche de lanoline anhydre fondue d'environ 1 cm. de hauteur. La lanoline forme rapidement, en se solidifiant, un bouchon adhérent à la paroi du tube.

Pour l'ensemencement, on utilise une pipette Pasteur dont l'effilure a été recourbée à angle droit, à son extrémité, ceci afin d'en éviter l'obturation par la matière grasse. La lanoline ayant été fluidifiée sur la veilleuse d'un bec de Bunsen, on glisse la pipette chargée de culture le long de la paroi du tube, on traverse rapidement la couche grasseuse et, une fois dans le bouillon, on laisse apparaître un léger nuage de culture au bout de l'effilure. On retire la pipette. Le bouchon de lanoline se reforme. On agite alors pour homogénéiser.

Les prélèvements se font suivant la même technique. Quand la pipette chargée est sortie du tube, elle est grasseuse à son extrémité. Pour éviter que des glo-

bules de lanoline ne viennent souiller la préparation, il suffit de casser l'effilure au-dessus de la partie graissée.

Cette technique nous a donné entière satisfaction. Si elle ne conduit pas à une anaérobiose stricte, elle nous a permis cependant de dégager des conclusions intéressantes de nos expériences. D'ailleurs, un critérium du degré d'anaérobiose atteint peut être tiré du fait que des doses relativement considérables de pyrogallol, ajoutées au milieu, ne lui communiquent pas la moindre trace de coloration brune.

5° **Température de culture.**

Toutes nos expériences ont été effectuées dans une chambre étuve à 25°. A cette température, le temps de génération est plus long, il est donc probable que les modifications morphologiques y prennent plus d'ampleur.

6° **Solution colorante.**

Nous avons utilisé, pour toutes nos préparations, la solution de fuchsine suivante :

Fuchsine.....	0 gr. 10
Alcool à 90°.....	1 cm ³
Eau distillée.....	100 cm ³

Après étalement, séchage par agitation à l'air, fixation par l'alcool-éther, on laisse agir le colorant quelques secondes.

7° Action particulière de chaque antiseptique sur le *Streptocoque*.

A. — Phénol.

Solution aqueuse à 2 %.

AÉROBIOSE.

Milieu glycérimé : la zone intéressante est réduite aux dilutions de 1/833, 1/625 et 1/550. On y observe de nombreuses chaînettes mixtes : cocci et bâtonnets rarement grossis. La dose inhibitrice correspond à 1/550.

Milieu non glycérimé : le phénol est nettement plus toxique qu'en présence de glycérine. La dose empêchante se situe à 1/625. Aux dilutions plus fortes, il n'y a pas de grandes variations morphologiques, à peine quelques grossissements.

ANAÉROBIOSE.

Milieu glycérimé : peu de modifications dans la forme des cocci. On note seulement un recul très net de la dose inhibitrice jusqu'à 1/366.

Milieu non glycérimé : quelques cocci géants. Les doses limites de culture sont les mêmes qu'en bouillon glycérimé.

CONCLUSIONS. — L'action du phénol sur le *Streptocoque* se traduit en aérobiose, par la formation de

quelques allongements et gonflements. Elle permet de confirmer le fait connu que la glycérine diminue sensiblement le pouvoir antiseptique du phénol.

En anaérobiose, par contre, en dehors de modifications morphologiques peu importantes, la glycérine ne semble avoir aucune influence sur la dose inhibitrice.

B. — Pyrocatéchine.

Solution aqueuse à 2 %.

AÉROBIOSE.

Milieu glycérimé : aux doses de 1/5.000 à 1/1.000, on constate, dans les cultures, des chaînettes mixtes très nombreuses. Les bâtonnets sont longs et nets. Tous les éléments sont, en général, très grossis ou géants. Dose inhibitrice : 1/830.

Milieu non glycérimé : mêmes constatations qu'en milieu glycérimé. Les allongements sont particulièrement nombreux de 1/1.666 à 1/1.000.

ANAÉROBIOSE.

Milieu glycérimé : la culture est plus rapide qu'en aérobiose. Dans l'ensemble, les éléments restent fins. Il y a formation de quelques bâtonnets.

Milieu non glycérimé : culture rapide, mais les cocci sont le plus souvent géants, avec de rares allongements.

CONCLUSIONS. — En aérobiose, avec ou sans glycé-

rine, les résultats sont identiques : production de formes allongées et de cocci géants.

En anaérobiose, les cocci restent fins dans le bouillon glycérimé, alors qu'ils sont régulièrement grossis en l'absence de glycérine, ce qui indiquerait, dans ce dernier cas, une toxicité plus grande. La dose inhibitrice est reculée en anaérobiose.

Nota. — Les cultures aérobies brunissent rapidement.

C. — Résorcine.

Solution aqueuse à 2 %.

AÉROBIOSE.

Milieu glycérimé : il faut arriver à de fortes concentrations pour constater les premières réactions du *Streptocoque*. A part quelques allongements à 1/625, nous n'avons noté de chaînettes mixtes qu'à 1/360, les éléments étant généralement grossis.

Milieu non glycérimé : peu de modifications morphologiques, même à 1/450. A peine quelques grossissements.

ANAÉROBIOSE.

Milieu glycérimé : la culture est très rapide. Les cocci poussent normalement dans l'ensemble, peu sont gonflés à 1/450 et 1/360.

Milieu non glycérimé : aucune variation de forme.

CONCLUSIONS. — La résorcine est un antiseptique

trop faible pour provoquer des modifications morphologiques importantes du *Streptocoque*. Les seuls résultats positifs sont obtenus dans les cultures aérobies, en bouillon glycérimé, à fortes doses.

Nota. — Les cultures aérobies se colorent rapidement.

D. — Hydroquinone.

Solutions aqueuses à 1 et 2 %.

AÉROBIOSE.

Milieu glycérimé : les premiers gonflements et allongements apparaissent à la dose de 1/5.000. On en trouve encore à 1/1.666. Dose inhibitrice : 1/1.250.

Milieu non glycérimé : dans quelques-unes de nos expériences, nous avons noté une culture à 1/2.500, avec chaînettes mixtes plus ou moins grossies, mais dans plusieurs autres cas, à 1/5.000 rien n'a poussé.

ANAÉROBIOSE.

Milieu glycérimé : dans tous les tubes d'une gamme allant de 1/10.000 à 1/1.100, la culture a été normale : pas de retard, pas de modifications morphologiques.

Milieu non glycérimé : même étendue du champ d'expérience qu'en milieu glycérimé, mêmes résultats, à part de très légers gonflements aux concentrations les plus fortes.

CONCLUSIONS. — En aérobiose, (a) en présence de glycérine : variations morphologiques : allongements, grossissements ; (b) sans glycérine : la toxicité de l'hydroquinone est incontestablement accrue.

En anaérobiose, l'action antiseptique de l'hydroquinone est nulle aux concentrations employées et ne se traduit par aucun phénomène, même en l'absence de glycérine.

Nota. — Les cultures aérobies brunissent rapidement.

E. — Pyrogallol.

Solution aqueuse à 2 %.

AÉROBIOSE.

Milieu glyciné : à la dilution de 1/5.000 apparaissent de nombreuses formes géantes. Tous les cocci sont géants à 1/2.500 et parfois soudés en bâtonnets. Les mêmes formes se retrouvent jusqu'à 1/800, mais les éléments sont de moins en moins nombreux.

Milieu non glyciné : on trouve d'emblée les formes géantes à 1/5.000. Toute culture semble impossible dès la dose de 1/1.250.

ANAÉROBIOSE.

Milieu glyciné : nos observations ont porté sur des dilutions allant de 1/5.000 à 1/300. Après quinze heures, à 25°, tous les tubes de cette vaste gamme

ont poussé et l'on n'y trouve que des chaînettes de *Streptocoque* très fin, sans aucune forme géante.

Milieu non glycérimé : mêmes constatations qu'en milieu glycérimé. Cependant, aux concentrations élevées (1/400), à côté d'une majorité de cocci fins, apparaissent quelques formes gonflées ou géantes, et, à 1/300, après neuf jours à 25°, la culture ne se produit pas.

CONCLUSIONS. — 1° en aérobiose, les cocci réagissent en donnant des formes géantes;

2° en anaérobiose, l'effet est nul, les cocci restent fins.

Cette différence totale d'action s'explique du fait que le pyrogallol, s'oxydant, donne un corps toxique. Pour confirmer cette constatation, nous avons fait une gamme, en anaérobiose, avec une vieille solution de pyrogallol, presque noire. Il a fallu attendre sept jours pour voir pousser 1/625, dix jours pour 1/550 et, après vingt-quatre jours, 1/400 était encore stérile.

3° Le pyrogallol est plus toxique dans les milieux privés de glycérine.

4° Le pyrogallol est plus toxique à 37° qu'à 25°.

Nota. — Dès les premières heures d'étuve, les cultures aérobies brunissent pour devenir, suivant les doses croissantes, presque noires. Les anaérobies restent identiques au tube témoin.

F. — Bisulfite de Sodium.

Solution aqueuse à 1 %.

AÉROBIOSE.

Milieux glycérimé et non glycérimé : la zone intéressante s'étend de $1/3.333$ à $1/1.250$. Entre ces limites, on constate des cocci gonflés ou géants et très souvent des allongements au sein des chaînettes.

ANAÉROBIOSE.

Milieux glycérimé et non glycérimé : l'action de l'antiseptique apparaît déjà à $1/10.000$. Cocci géants et bâtonnets alternent dans les chaînettes jusqu'à $1/1.250$. Dose inhibitrice $1/1.000$.

CONCLUSIONS. — Des résultats précédents, il ressort que la réaction du *Streptocoque* à des doses définies de bisulfite de sodium, se traduit régulièrement, quelles que soient les conditions de l'expérience, par des gonflements plus ou moins importants et par des allongements.

Nota. — La coloration des étalements correspondant aux fortes concentrations, s'est souvent avérée difficile et il arrive de constater des cocci entièrement incolores, sauf en un point prenant fortement la fuchsine.

G. — Hydrosulfite de Sodium.

Solution aqueuse à 2 %.

AÉROBIOSE.

Milieu glycérimé : l'apparition de cocci et bâtonnets géants a lieu déjà à la dilution de 1/2.500 jusqu'à 1/830 environ.

Milieu non glycérimé : cocci et bâtonnets géants de 1/1.660 à 1/1.000.

ANAÉROBIOSE.

Milieu glycérimé : les formes géantes se manifestent de 1/2.500 à 1/1.000. Au delà, la culture ne se produit pas.

Milieu non glycérimé : cocci géants de 1/2.500 à 1/625.

CONCLUSIONS. — L'action de l'hydrosulfite de sodium sur le *Streptocoque* se traduit régulièrement par la formation d'éléments géants, cocci ou bâtonnets. Les doses limites entre lesquelles se produisent ces modifications morphologiques varient peu, quelles que soient les conditions de l'expérience.

Nota. — La coloration des étalements s'effectue parfois difficilement.

H. — Sulficétone.

(Acétone + bisulfite de sodium en solution concentrée et récente). Solution aqueuse à 2 %.

AÉROBIOSE.

Milieu glycérimé : formes géantes aux concentrations de 1/625 et 1/550, dans ce dernier cas, seulement après trois jours d'étuve.

Milieu non glycérimé : cocci très grossis ou géants aux mêmes doses de 1/625 et 1/550.

ANAÉROBIOSE.

Milieu glycérimé : les formes géantes sont plus nettes qu'en aérobiose. Elles apparaissent déjà à 1/1000 jusqu'à 1/500. Nous avons noté, dans ces cultures, après six jours, une abondante multiplication de cocci fins.

Milieu non glycérimé : mêmes résultats, aux mêmes dilutions, qu'en bouillon glycérimé.

CONCLUSIONS. — La réaction du *Streptocoque*, en présence de sulficétone, est la production de formes géantes.

Nous avons constaté une plus grande toxicité en anaérobiose.

Nota. — De faibles traces d'antiseptique sur les étalements ont souvent empêché une bonne coloration des éléments, simulant la lyse.

I. — Acide borique.

Solution aqueuse à 2 ‰.

AÉROBIOSE.

Milieu glyciné. — A l'aide de la solution à 2 p. cent, diluée au 1/10, nous avons déterminé quelle était la dose minima d'acide borique provoquant des variations morphologiques du *Streptococcus* : 1/10.000. Entre cette dilution et la dose inhibitrice (1/830 environ) apparaissent des chaînettes mixtes, formées de bâtonnets très nets et de cocci non grossis.

Milieu non glyciné : les résultats sont comparables à ceux obtenus en bouillon glyciné.

ANAÉROBIOSE.

Milieu glyciné : chaînettes mixtes, cocci et bâtonnets, souvent hypertrophiés, parfois géants, depuis 1/660 jusqu'à 1/550. Aux fortes concentrations, les allongements n'apparaissent qu'après quelques jours d'étuve.

Milieu non glyciné : mêmes constatations qu'avec la glycérine. Nous avons observé, dans toutes nos expériences, de très beaux allongements filamenteux de 1/1660 à 1/550, avec maximum à 1/625, ces formes faisant toujours partie de chaînettes mixtes.

CONCLUSIONS. — a) Aérobiose : en présence ou non de glycérine, l'action de l'acide borique a pour effet

la production de formes allongées, non hypertrophiées en général.

b) Anaérobiose : la dose inhibitrice, dans les deux cas, est reculée de $1/830$ à $1/550$ par rapport à l'aérobiose et les allongements obtenus sont beaucoup plus importants.

J. — Novarsénobenzol.

Solution aqueuse à 0 gr. 20 %.

AÉROBIOSE.

Milieu glyciné : peu de modifications morphologiques, seulement quelques gonflements plus ou moins importants. Nos expériences ont porté sur une gamme allant de $1/50.000$ à $1/6.250$. Nous avons constaté un retard considérable dans le développement des cultures allant de trois jours ($1/25.000$) à sept jours ($1/6.250$).

Milieu non glyciné : les rares variations sont encore des gonflements. La période de latence précédant la multiplication est également très étendue : trois jours ($1/25.000$), sept jours ($1/10.000$). Dans certains cas, après treize jours, aucune culture ne se produit à $1/6.250$.

ANAÉROBIOSE.

Milieu glyciné : après dix jours d'étuve, $1/50.000$ seulement a cultivé. Les cocci sont fins.

Milieu non glyciné : après cinq jours, on constate,

seulement à la dose de 1/50.000, une culture de cocci non déformés. Après dix jours le résultat est le même.

CONCLUSIONS. — Bien que relativement très toxique vis-à-vis du *Streptocoque*, le novarsénobenzol n'a provoqué que de faibles réactions de sa part, se traduisant par des hypertrophies en général peu importantes.

Cette série d'expériences montre que ce n'est pas après les plus longs retards à la multiplication, qu'apparaissent les déformations les plus typiques ; elle prouve aussi la nocivité exceptionnelle du novarsénobenzol en anaérobiose, puisqu'une dose de 0 gr. 0002 empêche la culture pendant cinq et dix jours et qu'une dose de 0 gr. 0004 est inhibitrice.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE

Des expériences qui viennent d'être détaillées, il ressort que, sous l'influence d'antiseptiques de nature diverse, le *Streptocoque* présente des modifications morphologiques très importantes. On en distingue deux principales :

A. Les formes bacillaires.

B. Les formes géantes.

A. — Les formes bacillaires.

On peut les subdiviser en trois : a) les formes cocco-bacillaires ; b) les formes bacillaires proprement dites ; c) les formes filamenteuses.

a) FORMES COCCO-BACILLAIRES. — Elles sont un peu plus longues et plus grosses que les cocci ; elles apparaissent les premières dès que l'action de l'antiseptique se manifeste ; elles figurent, en quelque sorte, la transition entre les cocci et les bacilles.

b) FORMES BACILLAIRES PROPREMENT DITES. — Elles mesurent environ $4\ \mu$ de long et se présentent différemment : ou bien elles sont rectilignes, ou bien elles montrent un étranglement en leur centre, ou bien elles sont formées d'un corps principal fusiforme terminé à chaque extrémité par un renflement.

Nous avons obtenu ces formes bacillaires très nettes en particulier avec l'acide borique et la pyrocatéchine.

c) FORMES FILAMENTEUSES. — Rares dans nos expériences. Leurs dimensions sont toujours relativement faibles, 10 à 12 μ au plus. Elles sont rectilignes en général et le plus souvent incorporées dans des chaînettes mixtes avec cocci et bâtonnets. Parfois en un point quelconque, il y a un petit renflement ; parfois aussi, on distingue dans le corps filamenteux la série des cocci qui le constituent.

C'est en présence d'acide borique, en anaérobiose,

que nous avons obtenus les résultats les plus constants.

B. — Les formes géantes.

Elles résultent d'une hypertrophie importante des cocci qui peuvent atteindre 3 à 4 μ de diamètre. Ces formes sont toujours en chaînettes, alternant souvent avec des cocci non hypertrophiés ou des formes bacillaires également géantes.

Nota. — La mesure des éléments a été effectuée à l'aide d'un micromètre oculaire préalablement comparé à un micromètre objectif.

* * *

Après avoir décrit les différentes formes prises par le *Streptocoque*, nous allons essayer de tirer quelques notions générales de l'ensemble de nos expériences :

1^o Quelque soit l'antiseptique employé, les variations morphologiques apparaissent toujours dans la zone dysgénésique précédant la zone inhibitrice ;

2^o Cette zone dysgénésique est d'autant plus difficile à déterminer que l'antiseptique est plus actif, d'où difficulté de faire apparaître les variations de forme ;

3^o La production des formes anormales se fait au moment de la multiplication. Nous avons suivi l'apparition des bâtonnets, à la dilution de 1/2.500 d'acide

borique, en faisant de fréquents prélèvements. C'est après huit heures d'étuve à 25°, qu'apparaissent les premiers allongements. Après dix heures, ils sont déjà très nombreux ;

4° Les formes bacillaires ou filamenteuses sont constituées par des cocci plus ou moins intimement soudés, entourés d'une même membrane, et qui n'ont pu se dissocier ;

5° Toutes les formes anormales, réensemencées en bouillon privé d'antiseptique, redonnent des chaînettes classiques de cocci fins, dès le premier passage ;

6° L'action dysgénésique des antiseptiques se traduit toujours par un retard dans la multiplication. Nous avons noté des périodes de latence allant jusqu'à treize jours avec le novarsénobenzol ;

7° Il est fréquent d'observer l'apparition des chaînettes normales se substituant aux formes modifiées, après un séjour à l'étuve plus ou moins long. C'est un phénomène d'accoutumance ainsi décrit par L. Masson : « Les modifications morphologiques imprimées à la Bactérie pendant son accoutumance aux antiseptiques sont temporaires et correspondent à la phase d'adaptation ; elles disparaissent quand la Bactérie a atteint son maximum de résistance. Il existe ainsi un certain parallélisme entre la morphologie du microbe et l'une de ses propriétés biologiques, la résistance vitale aux agents chimiques ». Cependant,

il apparaît que, dans bien des cas, il n'y a pas retour à la forme normale au sein du milieu de culture. La multiplication s'arrête définitivement après la production des modifications morphologiques ;

8° Les formes anormales prennent le Gram comme les cocci normaux, ce qui est logique, la constitution fondamentale des microbes n'ayant pas changé ;

9° Parmi les antiseptiques employés, deux groupes se sont particulièrement signalés à notre attention :

a) les *réducteurs* : bisulfite de sodium, hydrosulfite de sodium, sulficétone provoquent la production de formes géantes. Les étalements sur lame entraînant des traces d'antiseptique, prennent mal le colorant. Il arrive parfois que tout le corps microbien est incolore sauf en un point qui a fortement fixé la fuchsine ;

b) les *polyphénols* : résorcine, hydroquinone, pyrogallol, déterminent également la formation d'éléments géants, mais en aérobiose seulement. En l'absence d'air, pas d'oxydation (pas de brunissement), pas de toxicité ;

10° Le phénol, l'hydroquinone et les autres phénols, avec moins de netteté, sont, en présence de glycérine, moins antiseptiques à l'égard du *Streptocoque* ;

11° La coloration des formes géantes montre, en leur centre, une zone prenant plus fortement la

fuchsine et qui apparaît ronde dans les formes rondes, allongée dans les formes bacillaires ;

12° On peut mettre en évidence l'accoutumance du *Streptocoque* aux antiseptiques en effectuant une vingtaine de passages en bouillon additionné d'acide borique. Le Streptocoque qui, au début, dans ce milieu, donnait des formes allongées très nettes, pousse normalement aux mêmes doses lors des derniers repiquages. L'accoutumance a donc reculé la zone dysgénésique.

CHAPITRE III

Action de la Lysocithine préparée avec les venins de Cobra (*Naja tripudians* Merr.) et de Vipère (*Vipera aspis* Merr.), sur le Streptocoque.

Au cours de l'étude des formes hypertrophiées du *Streptocoque*, précédemment décrites, notre attention s'est particulièrement fixée sur le corps, généralement central, que présente ce germe. Toujours plus intensément colorable par les colorants nucléaires, ce corps donne à première vue l'impression d'un noyau. Nous avons essayé de le différencier et de le libérer des autres portions de la cellule microbienne en faisant agir sur des cultures liquides du *Streptocoque* une solution de Lysocithine, préparée en partant des venins de Cobra et de Vipère.

Historique de la Lysocithine.

P. Kyes [47] fut le premier en 1903 à démontrer que le facteur complémentaire nécessaire à la produc-

tion de l'hémolyse des globules rouges par le Venin de Cobra est la lécithine. Il se forme une substance nouvelle : le cobra-lécithide hémolytique. L'hémolyse est empêchée par la cholestérine.

C. Delezenne et S. Ledebt [21], en 1911, approfondirent la question et provoquèrent la formation d'une substance hémolytique en faisant agir le venin de Cobra sur le sérum de cheval et sur le vitellus de l'œuf.

En 1914, S. Ledebt [49] étudia en détails les propriétés de cette substance hémolytique qu'elle appela : « Lysocithine ».

C. Delezenne et E. Fourneau [20], la même année, définirent sa composition chimique : c'est l'anhydride de l'éther palmito-glycérophosphorique de la choline, mélangé d'un peu d'éther stéarique.

Il est intéressant de noter que Fourneau et Page ont préparé synthétiquement une série d'éthers de la choline, parents de la Lysocithine, dont le pouvoir hémolytique est à peine inférieur à celui de la Lysocithine.

En 1932, G. Belfanti et C. Arnaudi [6] ont obtenu de la Lysocithine en faisant agir une diastase isolée du pancréas sur la lécithine du pancréas.

Préparation de la Lysocithine.

Quel qu'ait été le venin que nous ayions employé, la même technique fermentaire fut suivie, pour préparer la Lysocithine correspondante. Nous nous

sommes inspiré d'une part des recherches de Mlle S. Ledebt, et, d'autre part, de l'étude due à E. Rousseau, de la résistance à 70° de la phosphodiastase du venin de Cobra.

La technique de la préparation est la suivante : trois vitellus d'œufs, renfermant environ 3 gr. de lécithine, sont délayés au mortier dans 150 cm³ de sérum physiologique stérile. L'émulsion, additionnée de XX gouttes de toluène, pour empêcher le développement de germes exogènes au cours de la fermentation, reçoit 0 gr. 02 de venin de Cobra ou de Vipère, préalablement dissous dans 5 cm³ de sérum stérile. Cette émulsion est ensuite exactement maintenue à + 50° pendant trois heures.

Au cours de cette action thermique, la phosphodiastase du venin hydrolyse la lécithine du vitellus en donnant de la Lysocithine.

Une dessiccation de l'émulsion au bain-marie à + 80°, sous vide réduit, suit aussitôt l'opération fermentaire précédente, puis la masse plastique obtenue, jaune, coupée en fines lanières, est mise pendant douze heures au contact de 100 cm³ d'acétone anhydre, qui dissout l'huile du vitellus, le cholestérol et la lécithine qui a échappé à l'hydrolyse.

On décante l'acétone, les lanières sont séchées à l'air, pulvérisées finement et la poudre obtenue est mise une seconde fois au contact de 100 cm³ d'acétone anhydre.

Ce deuxième épuisement acétonique étant terminé, la poudre sèche de vitellus d'œuf est glissée dans une

cartouche en cellulose disposée dans une ampoule cylindrique à décantation, et épuisée par de l'alcool à 96° à la température de + 40°, jusqu'à ce qu'une goutte de ce solvant, déposée sur une lame flambée, n'abandonne plus rien à l'évaporation.

Toutes les fractions d'alcool d'épuisement sont réunies, filtrées, concentrées à 40 cm³ dans le vide. Ce liquide est trouble ; il s'éclaircit complètement quand, en dehors du vide, on le chauffe à + 60° environ. La Lysocithine est en effet plus soluble dans l'alcool chaud que froid. Le liquide alcoolique chaud, légèrement jaune, est versé par fractions successives dans un mélange de : 300 cm³ d'acétone anhydre, 200 cm³ d'éther anhydre.

Il se forme un flocculat neigeux de Lysocithine qu'on recueille, reprend une seconde fois par 40 cm³ à 50 cm³ d'alcool fort (à + 60°) et qu'on verse enfin dans le mélange d'acétone et d'éther. Le flacon est placé vingt-quatre heures à la glacière dont le froid aide au rassemblement du précipité de Lysocithine. On recueille celui-ci sur un double filtre, lequel est placé finalement dans le vide afin de débarrasser la Lysocithine amorphe, mais pure, de toutes traces d'acétone et d'éther.

La Lysocithine amorphe se présente sous un aspect cireux, ferme ; elle se dissout facilement dans l'eau à chaud (+ 50°-60°), mais, par le refroidissement, la solution se trouble.

Rendement pondéral.

Venin de Cobra de haut degré neurotoxique.

Le rendement en Lysocithine, avec 3 vitellus d'œufs, oscille entre 91 et 98 % du poids de la lécithine de ces jaunes.

Venin de Vipère.

Employé en mêmes proportions avec 3 vitellus d'œufs, toutes conditions fermentaires étant identiques pour les deux venins, le rendement a été de 60,2 %.

Action biophysique de la Lysocithine (Hémolyse).

Ce phosphatide est un agent d'hémolyse puissant, puisqu'il suffit de 0 mgr. 008 à 0 mgr. 01 de Lysocithine pour provoquer l'hémolyse (1 à 3 minutes) de 1 cm³ de globules de cheval à 5 %.

Cette action lytique est d'abord précédée de l'union immédiate de la Lysocithine avec le cholestérol hématique, cellulaire, molécule à molécule, en donnant un complexe indifférent (Lysocithine + cholestérol).

Ainsi que l'ont étudié Delezenne et Fourneau, l'association de ces deux substances donne naissance au complexe indifférent précité qui est dépourvu d'action hémolytique et cytolytique mais qui présente cette particularité de retenir l'eau avec la plus grande énergie.

Ces auteurs pensent que c'est à cette hygrophilie que doit être rapportée l'action si puissante de la Lysocithine. En s'unissant au cholestérol des globules rouges, la Lysocithine augmenterait le coefficient d'imbibition de ces éléments dans des proportions telles qu'il y aurait une diffusion du contenu protoplasmique au dehors par suite de l'éclatement de la membrane cellulaire.

En résumé, au cours de l'hémolyse par la Lysocithine, une réaction, biochimique d'abord, se traduit par la formation d'un complexe indifférent, inactif (Lysocithine + cholestérol). Elle est suivie d'une action biophysique qui, à son tour, provoque l'éclatement de l'enveloppe des hématies. Ces deux actions biophysique et biochimique sont presque simultanées.

Action cytolytique de la Lysocithine.

Mlle S. Ledebt écrit dans sa thèse : « Injectée aux animaux, la Lysocithine pure (exempte de toute trace de protéine) ne provoque la formation d'aucun anticorps ;

« En injection sous-cutanée, elle est atoxique et ne détermine que des phénomènes locaux (œdèmes, escharres, nécrose du tissu cellulaire) qui sont dus à son action cytolytique générale.

« La Lysocithine, ajoute l'auteur, n'est pas un poison exclusivement hémolytique, elle agit, à des degrés variables, sur la plupart des éléments cellulaires : c'est une cytolsine au sens le plus large du mot.

Elle détruit les leucocytes, les cellules épithéliales, les cellules des tissus ou des organes. Mise au contact, *in vitro*, avec les éléments cellulaires du foie, du cerveau, du rein, elle les altère profondément et si la dose employée est suffisante, elle les dissout totalement, comme elle dissout les hématies ».

En ce qui concerne plus particulièrement les leucocytes, E. Rousseau, qui poursuit, au Laboratoire du Professeur Lutz, des études hématologiques sur les néoplasies humaines, nous a montré que si l'action de la Lysocithine s'exerce instantanément sur l'enveloppe des polynucléaires (cholestérol), par contre leur noyau, libéré, résiste, pendant un temps plus ou moins long, à l'action du phosphatide ; c'est une question de temps et de dose.

Depuis l'époque (1914) à laquelle parut la thèse de Mlle S. Ledebt, d'autres recherches sont venues confirmer le pouvoir cytolytique de la lysocithine.

Tout d'abord A. Calmette, A. Saenz et E. Costil (13) ont recherché les effets cytolytiques exercés par le venin de Cobra dans l'adénocarcinome des souris. En injectant ce venin à quarante-huit heures d'intervalle, à doses infra-mortelles, dans des adénocarcinomes de la grosseur d'une noix, siégeant à la mamelle de la souris, la tumeur, à partir du seizième jour de la greffe, s'est affaissée, ramollie, s'est enfin ulcérée en laissant échapper, par ponction, un liquide jaune, amicrobien, constitué, à l'examen microscopique par des placards de substance nécrosée enser-

rant des cellules à l'état de dégénérescence hyaline très altérées.

De leur côté, C. Taguet et E. Rousseau [79], en injectant du Venin de Cobra (10 à 15 U. S.) à la base et autour d'épithéliomas du sein, en des endroits espacés, n'ont obtenu ni la régression, ni la fonte tumorale, mais des effets lytiques qui étaient localisés à chaque pertuis d'injection, d'où s'écoulait une sérosité jaune, amicrobienne, renfermant des cellules cancéreuses très altérées. L'action cytolytique, au cours de ces essais thérapeutiques, s'est toujours localisée au trajet des injections, par suite de l'impossibilité à laquelle se sont heurtés ces auteurs de pouvoir faire diffuser la solution de venin au travers de toute la masse tumorale, en raison de sa nature fibro-plastique.

Enfin, Guerrini [27], au cours de recherches sur les Lysocithines, a montré qu'à la suite d'injections internes, il y avait production d'hémorragies, car la Lysocithine détruit la paroi des capillaires.

*
* *
*

Ce sont les expériences de E. Rousseau, faisant agir la Lysocithine sur les leucocytes, qui ont été à l'origine de nos recherches sur l'action cytolytique possible de cette même substance sur le *Streptocoque* hypertrophié.

Action de la Lysocithine sur le *Streptocoque* hypertrophié.

Nous avons, tout d'abord vérifié l'absence de cholestérol dans la cellule microbienne, ce qui nous a permis d'éliminer l'hypothèse d'une action possible du complexe : Lysocithine + cholestérol sur l'enveloppe du *Streptocoque*.

A cet effet, une série de milieux gélosés (20 ‰) à base de peptone (20 ‰), de glucose (1 ‰) sontensemencés avec notre souche de *Streptocoque*. Après vingt-quatre heures d'étuve à + 37°, chaque tube de culture reçoit 6 cm³ de sérum physiologique, saturé d'éther, dans lequel on délaye les colonies à l'aide d'une baguette de verre stérilisée. Les liquides recueillis sont centrifugés, leur culot repris par une même quantité de liquide de lavage. Finalement, les culots, mélangés de poudre de verre lavée et stérile, sont desséchés dans le vide profond en présence de P²O⁵, puis pulvérisés et mis en contact de 5 cm³ de chloroforme pur. Dans ce liquide filtré, on recherche la présence du cholestérol par la méthode de Salkowsky. Nous n'avons pas obtenu la moindre coloration verte. On peut donc conclure à l'absence de cholestérol dans le *Streptocoque* et, par suite, à celle d'une action hydrophilique, comparable au phénomène d'éclatement des globules rouges, dans l'hémolyse.

Dans les expériences qui vont suivre, c'est donc au pouvoir cytolytique de la Lysocithine, qu'il faudra rattacher les phénomènes observés.

Deux Lysocithines, d'origine différente, ont été employées. Elles ont été préparées comme il a été décrit, l'une avec le venin de Cobra, l'autre avec le venin de Vipère. D'heure en heure, leur action cytolytique a été suivie comparativement sur le *Streptocoque* hypertrophié sous l'influence des antiseptiques, et sur le *Streptocoque* normal. Il était en effet permis de supposer que l'hypertrophie du corps microbien favoriserait notablement la cytolyse, par diminution de résistance.

Solution de Lysocithine.

La Lysocithine est employée en solution aqueuse, généralement à la concentration de 0 gr. 05 pour 10 cm³ d'eau stérile. Cette solution est pasteurisée à 70° pendant trente minutes. Des essais de stérilisation à 120°, pendant quinze minutes, ont d'ailleurs été concluants : la Lysocithine conserve intact son pouvoir hémolytique et cytolytique.

Technique.

Dans les premières expériences, le contenu d'une pipette Pasteur correspondant à 5 mgr. de Lysocithine, par exemple, était ajouté au tube de culture liquide et le tout porté à l'étuve à + 37°.

Cette façon de faire, bien que donnant des résultats certains — mais inconstants, — avait le double inconvénient, d'une part de mettre en présence une quantité connue de Lysocithine et une culture plus ou

moins abondante, très difficile à évaluer, d'autre part de ne pas tenir compte de l'antiseptique présent dans le bouillon et qui aurait pu jouer un rôle empêchant ou favorisant vis-à-vis de la Lysocithine.

Aussi la technique suivante a-t-elle été arrêtée pour la suite des opérations :

1° Faire développer du Streptocoque en présence de doses convenables d'antiseptique, pour obtenir, après vingt-quatre heures d'étuve à $+ 25^{\circ}$, des formes géantes ;

2° Centrifuger pendant vingt minutes ;

3° Décanter le bouillon ; délayer le culot dans 8 à 10 cm³ d'eau stérile ;

4° Laver à l'eau stérile, par centrifugation, pendant vingt minutes. Décanter ;

5° Délayer le culot dans X gouttes d'eau stérile. La suspension microbienne obtenue est très épaisse ;

6° Prélever dans cette suspension 2 ou 3 anses et les porter dans un tube large, stérilisé, où l'on a déjà introduit X gouttes de la solution de Lysocithine et compléter le volume total à 1 cm³ au moyen d'eau stérile ;

7° Agiter le mélange et porter à l'étuve à $+ 37^{\circ}$.

Nota. — a) Les gouttes sont ajoutées avec le compte-gouttes de Duclaux ;

b) La même technique a été suivie dans le cas du *Streptocoque* normal, on supprime seulement le lavage du culot à l'eau stérile ;

c) L'évaluation du nombre des germes est faite par

comparaison avec l'opacité d'une suspension titrée, servant de témoin.

La détermination du pouvoir cytolytique de la Lysocithine s'effectue de la façon suivante :

De demi-heure en demi-heure, le tube contenant le mélange est sorti de l'étuve et, rapidement, on procède, avec l'anse de platine, à un étalement. Celui-ci est alors séché à l'air, fixé à l'alcool éther, puis coloré avec une solution de fuchsine diluée.

Un étalement témoin est fait au début de chaque expérience.

*
* * *

Nous avons successivement étudié :

I. L'action de la Lysocithine de Venin de Cobra sur le Streptocoque hypertrophié.

II. L'action de la même Lysocithine sur le Streptocoque normal.

III. L'action de la Lysocithine de Venin de Vipère sur le Streptocoque hypertrophié.

IV. L'action de la même Lysocithine sur le Streptocoque normal.

I. — Action de la Lysocithine de Venin de Cobra sur le Streptocoque hypertrophié.

Le pyrogallol, à la concentration de 1/2.500, a été l'antiseptique généralement choisi pour provoquer l'hypertrophie des cocci.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Cytologie du Streptocoque.

FIG. 1. — Streptocoque normal.

FIG. 2. — Streptocoque hypertrophié en présence du pyrogallol.

FIG. 3. — Streptocoque hypertrophié soumis à une lyse ménagée par la lysocythine de venin de Cobra. Les corps nucléaires résistent à la lyse et sont devenus nettement distincts. Gr. uniforme = 1800 d.

Les microphotographies reproduites sur cette planche ont été exécutées par M. Auguste LUMIÈRE, auquel nous exprimons nos plus chaleureux remerciements.

I



II



III



Deux séries d'expériences ont été faites à des doses variables de Lysocithine :

1^o Emulsion microbienne de 1 milliard au centimètre cube.

X gouttes de solution de Lysocithine à 0 gr. 005 par centimètre cube, soit : 0 gr. 0025.

X gouttes d'eau stérile.

Volume total 1 cm³.

Dilution de la Lysocithine : 1/400.

POUVOIR CYTOLYTIQUE.

Témoin, au début de l'expérience : cocci géants se colorant bien.

Après une demi-heure de contact à 37° la coloration des éléments géants est floue.

Après une heure, se manifeste une différenciation très nette de la substance du corps microbien en zones claires et en zones plus foncées. Cette dissociation s'accroît ; elle est totale au bout de cinq à six heures. Les cocci ont alors l'aspect suivant : ils sont franchement hypertrophiés par rapport au témoin : le corps microbien est comme vidé de sa substance dans sa majeure partie qui ne prend plus le colorant que très faiblement. Seul, à la périphérie, un point ou une zone mince reste très coloré. Le plus souvent, ce sont deux points de résistance que l'on observe dans chaque coccus. Il n'y a pas d'éclatement de la cellule dont le contour est parfaitement visible.

Si l'on fait un étalement après vingt-quatre heures

ou quarante-huit heures, on ne constate aucune modification.

2° Emulsion microbienne de 1 milliard au centimètre cube.

II gouttes de solution de Lysocithine à 0 gr. 005 par centimètre cube, soit : 0 gr. 0005.

XVIII gouttes d'eau stérile.

Volume total : 1 cm³.

Dilution de la Lysocithine : 1 2.000.

POUVOIR CYTOLYTIQUE.

Après une demi-heure de contact, la coloration des éléments perd sa netteté. La dissociation est totale après six heures environ.

Nota. — Les résultats sont identiques avec des cocci hypertrophiés sous l'influence de bisulfite de sodium et en bouillon glycérimé ou non.

II. — *Action de la Lysocithine de Venin de Cobra sur le Streptocoque normal.*

1° Emulsion microbienne de 1 milliard au centimètre cube.

Dilution de la Lysocithine 1/400.

POUVOIR CYTOLYTIQUE.

Témoin : cocci fins prenant bien le colorant.

Après une demi-heure de contact, la coloration des cocci est *floue*. La dissociation, amorcée après une

heure, s'accentue et semble définitive au bout de trois à quatre heures. Les éléments sont alors légèrement hypertrophiés. Dans le corps microbien incolore, ou presque, apparaissent nettement une ou deux petites condensations fortement colorées :

2^o Emulsion bactérienne de 1 milliard au centimètre cube.

Dilution de la Lysocithine : 1/2.000.

POUVOIR CYTOLYTIQUE.

Il est de même intensité au point de vue temps et résultats qu'à 1/400.

III. — *Action de la Lysocithine de Venin de Vipère sur le Streptocoque hypertrophié.*

L'hypertrophie du *Streptocoque* est obtenue par le pyrogallol à la concentration de 1/2.500.

1^o Emulsion bactérienne de 1 milliard au centimètre cube.

Dilution de la Lysocithine : 1/400.

Témoin : cocci géants bien colorés.

POUVOIR CYTOLYTIQUE.

Même après vingt heures de contact la cytolyse n'est pas apparente, à peine peut-on noter çà et là une vague différenciation des éléments en zones claires et foncées.

La dose de Lysocithine paraît donc insuffisante.

2° Emulsion microbienne de 1 milliard au centimètre cube.

Dilution de la Lysocithine : 1/200.

POUVOIR CYTOLYTIQUE.

Les résultats ne sont guère plus nets qu'à 1/400.

3° Emulsion microbienne de 1 milliard au centimètre cube.

X gouttes de solution de Lysocithine à 0 gr. 015 par centimètre cube, soit : 0 gr. 0075.

X gouttes d'eau stérile,

Volume total : 1 cm³.

Dilution de la Lysocithine : 1/133.

Nota. — La solution de Lysocithine à 0 gr. 15 pour 10 cm³ prend, à froid, une consistance visqueuse. Il faut la réchauffer à 40° environ pour la rendre claire et limpide.

POUVOIR CYTOLYTIQUE.

Il est net. Après deux heures de contact chaque coccus présente deux condensations polaires alors que la partie centrale est incolore. Après cinq à six heures, beaucoup d'éléments sont vidés de leur substance sauf un point résistant fortement coloré.

IV. — *Action de la Lysocithine de Venin de Vipère sur le Streptocoque normal.*

Emulsion microbienne de 1 milliard au centimètre cube.

Dilution de la Lysocithine 1/133.

POUVOIR CYTOLYTIQUE.

Les résultats sont identiques à ceux obtenus, à la même concentration, avec le *Streptocoque* hypertrophié.

Détermination du pouvoir bactéricide des Lysocithines de Venins de Cobra et de Vipère.

Parallèlement à la recherche du pouvoir cytolytique, nous avons fait, de demi-heure en demi-heure, des ensemencements, en bouillon, du *Streptocoque* mis en contact avec la Lysocithine. Les résultats obtenus ont été très satisfaisants, en ce sens que le *Streptocoque*, dans tous les cas, était tué après deux heures de contact, en moyenne. Nous avons alors fait un essai témoin en émulsionnant les cocci dans de l'eau stérile, sans Lysocithine. Après deux heures de contact également, les germes étaient tués (mais ne présentaient aucune modification intérieure).

Force nous a donc été d'abandonner nos recherches par cette méthode. Nous avons alors adopté la technique suivie avec les antiseptiques, dans la première partie de notre travail.

Dans une série de tubes de bouillon on introduit des doses croissantes de Lysocithine et on ensemence.

Les résultats ont été les suivants :

Pour la Lysocithine de Venin de Cobra, la dilution de $1/10.000$ est mortelle pour le *Streptocoque*.

Pour la Lysocithine de Venin de Vipère, la dose toxique s'établit à $1/16.000$ environ.

Remarque. — Aux fortes concentrations, les cocci ensemencés ne se sont pas multipliés, mais sont lysés de la même façon que s'ils étaient en contact direct avec la Lysocithine. Ce fait semble avoir été entrevu par Taddei [78], au cours de ses recherches sur l'action de la Lysocithine sur les micro-organismes. Cet auteur classe les Bactéries, suivant leur comportement vis-à-vis de la Lysocithine, en lyso-fortement sensibles, lyso-sensibles et lyso-résistantes.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE

Les précédentes expériences permettent de formuler les conclusions suivantes :

1° La Lysocithine du Venin de Cobra possède un pouvoir cytolitique très intense vis-à-vis du *Streptocoque*. Ce microbe est hypertrophié et dissocié en zones nettement distinctes, l'une, la plus volumineuse, ne fixant plus la fuchsine, l'autre, ou les autres, punctiformes en général, fortement colorées ;

2° A la concentration de $1/2.000$, le pouvoir cyto-

tique de la Lysocithine de Venin de Cobra est net. Il est certain que la dose d'action limite est beaucoup plus faible encore ;

3° La même action cytolytique est observée aussi bien sur le *Streptocoque* normal que sur le *Streptocoque* hypertrophié sous l'influence d'antiseptiques quelconques. Cependant, dans ce dernier cas le phénomène est beaucoup plus visible. L'hypertrophie préalable n'est qu'un artifice ;

4° La Lysocithine de venin de Vipère possède un pouvoir cytolytique comparable à celui de la Lysocithine de venin de Cobra, mais nécessite des concentrations beaucoup plus fortes (15 fois) ;

5° Dans sa thèse, Mlle Ledebt souligne que la Lysocithine de venin de Cobra est un véritable poison cellulaire. Nos observations concernant le *Streptocoque* confirment cette opinion.

En effet, la Lysocithine de venin de Cobra, agissant sur le *Streptocoque*, peut être classée parmi les bactéricides puissants. Quant à la Lysocithine de venin de Vipère, elle se montre encore plus toxique. Ainsi la première qui possède le plus fort pouvoir cytolytique est moins toxique que la seconde et réciproquement. De cette constatation, il résulte que les pouvoirs cytolytique et bactéricide des Lysocithines en général, sont différents. Cette conclusion confirme celle de Franz pour qui les propriétés lytiques et toxiques des venins de Vipère et de Crotale doivent être considérées comme appartenant à deux principes différents.

CHAPITRE IV

Considérations sur la cytologie du corps microbien.

Nous avons passé en revue, dans la partie bibliographique, les diverses opinions émises au sujet du noyau des Bactéries. Rappelons-les sommairement.

Certains auteurs (Alexeieff, Wamoscher) nient la présence du noyau ; d'autres, plus nombreux, l'admettent, mais ne sont pas d'accord quant à la répartition de la substance nucléaire : les uns (A. Meyer, Mencl) sont partisans d'un noyau typique, central ; les autres (Guilliermond, Dobell) d'un noyau diffus dans tout le cytoplasme ; d'autres enfin (Ruzicka, Ambroz) considèrent la cellule bactérienne comme une sorte de noyau libre.

Tous les expérimentateurs, ou presque, ont utilisé les seules méthodes de coloration pour mettre en évidence la substance nucléaire dans le corps microbien : colorations vitales ou après action de fixateurs divers. Les techniques employées n'ayant pas, en somme, conduit à des résultats indiscutables, — puisque à l'heure actuelle, la controverse dure encore —

il nous a paru intéressant d'aborder le problème à la lumière du nouveau procédé d'investigation basé sur l'action de la Lysocithine.

Au centre des formes géantes du *Streptocoque*, obtenues sous l'influence d'antiseptiques variés, nous avons discerné une zone beaucoup plus intensément colorable par la fuchsine que le reste du corps microbien.

L'action cytolitique de la Lysocithine de Cobra, nous a permis d'isoler ce corps central.

En effet, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent, quelques heures de contact avec la Lysocithine suffisent à vider le coccus de sa substance. Seule résiste et se colore fortement par la fuchsine une petite granulation ronde ou un peu allongée qui se trouve toujours à la périphérie de l'élément.

Nous avons renouvelé l'expérience avec le *Streptocoque* normal, non hypertrophié: le même phénomène s'est produit dans des conditions à peu près identiques, mais ici l'observation se montre beaucoup plus délicate en raison de la taille moindre des cocci.

Il est donc permis de supposer que, lors de l'hypertrophie par les antiseptiques, c'est le cytoplasme seul qui se gonfle, distendant la membrane ; mais le corps central ne subit aucune modification. Lorsque la Lysocithine pénètre le corps microbien, elle lyse le cytoplasme mais respecte ce que nous croyons dès lors autorisé à appeler un noyau. E. Rousseau n'a-t-il pas noté de son côté une résis-

tance spéciale du noyau des polynucléaires à la Lyso-cithine, alors que le reste de la cellule est lysé ?

Nous nous rangeons donc résolument aux côtés des partisans du noyau typique chez les cocci.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1^o Confirmant les expériences nombreuses qui avaient montré de profondes variations morphologiques chez les Bactéries, placées en milieu défavorable, nous avons obtenu avec le *Streptocoque* des changements de forme importants.

Pour les provoquer nous nous sommes adressé à quelques antiseptiques de nature chimique diverse.

Sans pouvoir affirmer que telle catégorie d'antiseptiques détermine à coup sûr telle ou telle variation morphologique, il semble cependant logique de penser, au terme de ce travail, que les réducteurs, en général, sont à l'origine des formes dites géantes. Sans doute en raison de ce fait que tout phénomène réducteur est constructif alors que l'oxydation est destructive.

2^o Si nous avons pu observer des allongements relativement importants, jamais il ne nous a été donné de constater même une ébauche de ramification.

3^o La Lysocithine de Venin de Cobra dont l'action cytolytique sur toutes les cellules animales est depuis

longtemps connue, est également active vis-à-vis des cellules bactériennes et en particulier du *Streptocoque*, dont la substance est presque entièrement lysée.

4° La Lysocithine de Venin de Vipère possède également un pouvoir cytolytique sur le *Streptocoque*, mais à des concentrations beaucoup plus fortes que la Lysocithine de Venin de Cobra.

5° Dans le corps microbien lysé, une petite zone, souvent punctiforme, résiste et prend seule le colorant. La périphérie de la cellule demeure visible.

6° Il est permis de penser que la particule lysorésistante est de nature nucléaire. En effet, son affinité pour les colorants du noyau reste entière au cours et à la fin de la cytolyse. On peut dès lors admettre que la cellule streptococcique renferme un noyau typique et non diffus.

7° A côté du pouvoir cytolytique, les Lysocithines de Venins de Cobra et de Vipère possèdent un pouvoir toxique élevé, plus fort pour la Lysocithine de Venin de Vipère.

8° Les deux pouvoirs cytolytique et toxique sont différents l'un de l'autre.

9° Corroborant les résultats expérimentaux de nombreux auteurs, nous avons noté une action toxique très nette de l'eau distillée stérile vis-à-vis du *Streptocoque*. A ce sujet, pour comparer avec fruit les

diverses expériences, il faudrait connaître la composition microchimique de l'eau, car il est bien évident que des traces infinitésimales de tel métal ou de tel autre peuvent modifier, dans des proportions variables, le pouvoir toxique de l'eau qui les contient.

Vu : le Président de la thèse,
L. LUTZ.

Vu : le Doyen,
PAUL GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer :
le Recteur de l'Académie de Paris,
G. ROUSSY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ALEXEIEFF (A.). — Sur la structure des Bactéries. Les mitochondries et les grains métachromatiques chez les Bactéries et quelques autres Protistes. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXIX, p. 727, 1923.
2. AMATO (A.). — Ueber die feine Struktur der Bakterien. *Centralbl. f. Bakter., I., Origin.*, t. XLVIII, n° 4, p. 385, 1908.
3. AMBROZ (A.). — Entwicklungszyklus des *B. nitri*, *sp. n.*, als Beitrag zur Cytologie der Bakterien. *Centralbl. f. Bakter., I., Origin.*, t. LI, p. 193, 1909.
4. ARLOING (S.). — Variations morphologiques du Bacille de la tuberculose de l'homme et des mammifères obtenues artificiellement. *C. R. Acad. Sc.*, t. CXLVI, p. 100, 1908.
5. BAERTHLEIN. — Ueber Mutationserscheinungen bei Bakterien. *Arb. a. d. Kais. Gesundh.*, t. XL, f. 4, p. 433, 1912.
6. BELFANTI (J.) et ARNAUDI (C.). — Sur une lécithase du pancréas produisant la lysocithine. *Boll. Sezione Soc. internaz. Microbiol.*, fasc. II, p. 399, 1932.
7. BILLROTH. — Untersuchungen über die Vegetationsformen der *Coccobacteria septica*. Berlin, 1874.
8. BLANCHARD (D.). — Contribution à l'étude de la multiplication et des formes d'involution des Cocci pyogènes. *Thèse Doct. Pharmacie*. Paris, 1936.
9. BOQUET et NÈGRE. — Polymorphisme et détermi-

- nisme morphogénique du Cryptocoque de Rivolta. *Ann. Inst. Past.*, t. XXXIII, p. 184-190, 1919.
10. BORDET (P.). — Influence du Calcium sur les caractères des espèces microbiennes. *Ann. Inst. Past.*, p. 26, 1930.
11. BRIERLEY (W. B.). — Variation in Fungi and Bacteria. *Proc. Internat. Congress of Plant Sc.*, t. II, p. 1629-1654, 1929.
12. BUCHOLTZ. — *Archiv. f. experiment. Pathol. und Pharm.*, vol. VII, p. 81, 1875.
13. CALMETTE (A.), SAENZ (A.) et COSTIL (L.). — Effets du venin de Cobra sur les greffes cancéreuses et sur le cancer spontané (adéno-carcinome) de la Souris. *C. R. Acad. Sc.*, t. CXCVII, p. 205, 1933.
14. CIENKOWSKI. — Zur Morphologie der Bakterien. *Mém. Acad. Impér. Sc. Saint-Petersbourg*, t. XXV, n° 11, 1877.
15. CLARK (P. F.) et RUEHL (W. H.). — Morphological changes during the growth of Bacteria. *Journ. of Bact.*, t. IV, p. 615, 1919.
16. COHN. — Beiträge zur Biol. der Pflanzen. *Breslau*, 1875.
17. COUPIN (H.). — De l'action morphogénique de la salure sur les bactéries marines. *C. R. Acad. Sc.*, t. CLX, p. 608-610, 1915.
18. CUNHA (A. M. DA) et MUNIZ (Julio). — Réaction nucléaire de Feulgen chez les Spirochètes et les Bactéries. *Inst. Oswaldo Cruz (Suppl. das Memorias)*, n° 4, p. 145, 1928.
19. DANTE DE BLASI. — Sur une forme non commune du Streptocoque dans l'urine. *Ann. d'Igiene Sper. Roma*, t. XXIII, p. 437, 1913.
20. DELEZENNE (C.) et FOURNEAU (E.). — Constitution du phosphatide hémolysant (lysocithine) provenant de l'action du venin de Cobra sur le vitellus de

l'œuf de poule. *Bull. Soc. chim. Fr.*, t. XV-XVI, n° 8, p. 234 et p. 424, 1914.

21. DELEZENNE et LEDEBT. — Formation de substances hémolytiques et de substances toxiques aux dépens du vitellus de l'œuf soumis à l'action du venin de Cobra. *C. R. Acad. Sc.*, t. CLII, p. 81, 1911.
22. DOBELL (Cl.). — Contribution to the cytology of the Bacteria. *Quart. Journ. of micr. Science*, t. LVI, f. 3, 1911.
23. DOUGLAS (S. R.) et DISTASO (A.). — Etude sur le noyau des Bactéries. 1^{er} mémoire. Sur un nouveau bacille dont le noyau est très évident. *Centralbl. f. Bakter.*, I., t. LXIII, 1912.
24. DUCLAUX. — Action antiseptique de l'acide formique. *Ann. Inst. Pasteur*, p. 465, 1887.
25. FLÜGGE. — Die Mikroorganismen. *Leipzig*, 1896.
26. GOTSCHLICH (E.). — Allgemeine Morphologie und Biologie der pathogenen Mikroorganismen. I. Variabilität der pathogenen Bakterien. *Handbuch der pathog. Mikroorgan.* Bd I, p. 206-249, 1927.
27. GUERRINI (G.). — Recherches sur les lysocithines. *Arch. Ital. Biol.*, t. LXXVII, 1926.
28. GUIGNARD (L.). — L'espèce et le polymorphisme en Bactériologie. *Revue générale des Sciences*, p. 844-847, 1894.
29. GUIGNARD (L.) et CHARRIN. — Sur les variations morphologiques des microbes. *C. R. Acad. Sciences*, t. CV, p. 1192, 1887.
30. GUILLIERMOND (A.). — A propos de la structure des bacilles endosporés. *Arch. f. Protistenkunde*, t. XIX, 1910.
31. GUSTEIN (M.). — Ueber den Kern und den allgemeinen Bau der Bakterien. *Centralbl. f. Bakter.*, I., t. XCV, p. 357-387, 1925.

32. HENRI (M^{me} V.). — Etude de l'action métabiotique des rayons ultra-violets. Modification des caractères morphologiques et biochimiques de la Bactérie charbonneuse. *C. R. Acad. Sciences*, t. CLIX, p. 340, 1914.
33. HENRICI (A. T.). — Morphologic variations and the rate of growth of Bacteria, 1 vol., 1928, p. 194. *Baillière, Tindall et Cox*. London.
34. HOLLANDE (A. Ch.). — Contribution à l'étude cytologique des microbes (*Coccus, Bacillus, Vibrio, Spirillum, Spirochaeta*). *Arch. f. Protistenk.*, t. LXXXIII, fasc. 3, p. 465-608, 1934.
35. JALAN DE LACROIX. — Das Verhalten der Bakterien des Fleischwassers gegen einige Antiseptica. *Arch. für experim. Pathol.*, t. XIII, p. 175, 1881.
36. JUNGEBLUT (C. W.). — Ueber Festigungsversuche an Bakterien mit besonderer Berücksichtigung der physikalisch-chemischen Veränderungen. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XCIX, p. 254-283, 1923.
37. KAPLAN (M^{me}). — Influence du nombre des microbes ensemencés sur la multiplication du Bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. *Thèse Doct. Pharmacie*, Paris, 1931.
38. KERMORGANT (Y.). — Variations morphologiques du Streptocoque. *C. R. Soc. Biol.*, t. II, p. 642, 1922.
39. KIRCHENSTEIN (A.). — Morphologie, développement et signification des formes bactériennes dégénérées. *Acta Universitatis Latviensis*, n° 2, p. 135, Riga, 1923.
- Sur la structure et le mode de développement des Bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXV, p. 787, 1921.
- Sur la morphologie et le mode de développement des formes atypiques des Bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXVIII, p. 716, 1923.

40. KOCH. — Untersuchungen über Bakterien. *Cohn's Beitrag zur. Biol. der Pflanzen*, II, s. 399, 1897.
41. KÖHNE (W.). — Beitrag zur Kenntnis arzneifester Bakterienstämme. *Zeits. f. Immunitätsf. I. Orig.*, t. XX, p. 531, 1914.
42. KOSSIAKOFF. — De la propriété que possèdent les microbes de s'accommoder aux milieux antiseptiques. *Ann. Inst. Pasteur*, I, p. 465, 1887.
43. KRONGOLD-VINAVER (S.). — Pouvoir pathogène et virulence des Streptocoques. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXIII, p. 253, 1920.
44. KROSKOWSKA et NISTCH. — *Centralbl. f. Bakter. I Origin.*, Bd LXXXII, p. 264, 1918.
45. KRUIS (K.). — Mikrophotographie der Strukturen lebender Organismen, insbesondere des Bakterienkerne mit ultra violettem Licht. *Académie des Sciences de Bohême*, 1913.
46. KUFFERATH. — Sur la forme et la culture du *Bacterium Coli* sur gélose minéralisée et lactosée. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXV, p. 16, 1921.
47. KYES. — Ueber die Isolierung von Schlangengift-Lecithiden. *Berl. klin. Woch.*, t. XL, pp. 956-959 et 982-984, 1903.
48. LASSEUR. — Contribution à l'étude du *Bacillus Le Monnieri*. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXIV.
49. LEDEBT (S.). — Contribution à l'étude des propriétés biologiques des venins. Action des venins de serpents et des poisons qu'ils engendrent sur quelques vertébrés aquatiques. *Thèse Doctorat ès Sciences naturelles*, Paris, 1914.
50. LESBROS (M.). — Accoutumance et anaphylaxie chez les Microbes. *Thèse Sciences*, Lyon, 1927.
51. LINDEGREN (L.). — Genetical studies of Bacteria. The problem of the bacterial nucleus. *Centralbl. f. Bakter.*, II, t. XCII, p. 41, 1935.

52. MARCHAL (J.-G.). — Variation et mutation en Bactériologie. *Thèse Sciences*, Paris, 1932.
53. MARKS. — Ueber einen arsengesten Bakterienstamm. *Zeitsch. f. Immunität*, I. Orig. Bd VI, p. 293, 1910.
54. MASSON (L.). — Essai sur l'adaptation des Bactéries aux antiseptiques. *Thèse Pharmacie*, Paris, 1910.
55. MENCL (E.). — Die Bakterienkerne und die « cloisons transversales Guilliermonds ». *Arch. f. Protistenk.*, t. XVI, f. I, 1909.
56. METCHNIKOFF (E.). — Note sur le pléomorphisme des Bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, t. III, p. 61, 265, 1889.
57. MEYER (A.). — Der Zellkern der Bakterien. *Flora*, t. XCVIII, f. 3, 1908.
58. MILLISCHER (P.) et CHAILLOT (L.). — Le polymorphisme du Streptocoque. *Bull. Soc. Path. exot.*, p. 761, 1931.
59. MINOUX (M.). — La forme des Bactéries. *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1927.
60. MORI (N.). — Di un nuovo batterio patogeno e di molti altri batteri nei quali puo provocarsi l'individuazione di un nucleo tipico. *Ann. d. Staz. Sper. p. l. mallatie ineffective del bestiame*, t. I, Naples, 1913.
61. NADSON (C. A.) et PERFILIEV (B. W.). — Sur la structure du protoplaste chez l' « *Achromatium oxaliferum* » Schew. *Bull. du principal jardin botanique de la République Russe*, t. XXII, 1923.
62. NAEGELI. — Theorie der Abstammungslehre, 1884.
63. NATIVELLE (R.). — Relations entre le pouvoir pathogène et le cycle évolutif de quelques microbes et du Streptocoque en particulier. *Annales de Médecine*, t. XLI, n° 4, 1937.
64. PAKES. — L'effet des hauts pourcentages de nitrates

- sur la morphologie de certains microbes. *Trans. pathol. Soc. London*, t. LII, p. 246, 1901.
65. PALGEN (W. B.). — Essai sur la Biologie de quelques Bactéries. *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1925.
66. PÉJU et RAJAT. — Polymorphisme expérimental du bacille d'Eberth. Variations morphologiques du bacille d'Eberth, sous l'influence de certains sels. Parallélisme de l'évolution des caractères morphologiques du bacille d'Eberth et de ses caractères biologiques. Le Colibacille dans les milieux salins. *C. R. Soc. Biol.*, t. LX, p. 336, 468, 494, 628, 1906.
- Note sur le polymorphisme des Bactéries dans l'urée. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXI, p. 477, 1907.
- Sur l'étendue et le mécanisme du polymorphisme des Bactéries par les agents chimiques. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXIII, p. 735, 1907.
67. PETTER (H.). — La réaction nucléale de Feulgen chez quelques végétaux inférieurs. *C. R. Acad. Sciences*, t. CXCVII, p. 88, 1933.
68. RAY LANKASTER. — Further observations on a peach-or red-coloureds bacterium. *Bacterium rubescens*. *Quart. 5. Micr. Sc.* London, N. S. XVI, p. 27, 1876.
69. RAYMAN (B.) et KRUIS (K.). — Des noyaux des Bactéries. *Bull. Intern. Acad. Sciences de Bohême*, 1903.
70. REGENSTEIN (H.). — Studien über die Anpassung von Bakterien an Desinfektionsmittel. *Centralbl. f. Bakter.*, I, *Orig.*, t. LXIII, 1912.
- 70 bis. RICHET (Ch.). — Adaptation des microbes (ferment lactique) au milieu. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXIX, p. 22, 1915.
71. RIPPEL. — Variabilität bei Bakterien. *Med. Klin. Wochenschrift f. praktische Aertze*, 1929.
72. RODET. — De la variabilité dans les microbes. Paris, *Baillière*, 1894.
73. ROLIN (M.). — La forme des Bactéries. Influence de

quelques facteurs physico-chimiques sur leur morphologie. *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1929.

74. ROUSSEAU (E.). — L'activité fermentaire de la phosphodiastase du venin de Cobra en solution aqueuse, après chauffage à 70°. *C. R. Soc. Biol.*, t. CXVII, p. 565, 1934.
75. RUZICKA (V.). — Weitere Untersuchungen über den Bau und die allgemein-biologische Natur der Bakterien. *Archiv. f. Hyg.*, t. LI, p. 281, 1904.
76. SARTORY et NONOTTE. — Contribution à l'étude du *Bacillus anthracis*. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXV, p. 215, 1908.
77. SWELLENGREBEL. — Sur la cytologie de *Sphaerolitus natans*. *C. R. Soc. Biol.*, t. LXV, p. 41, 1908.
78. TADDEI (A.). — L'azione della lisocitina sui microorganismi. *Boll. Istit. Sier. milanese*, t. II, f. 8, p. 489-511, 1932.
79. TAGUET (C.) et ROUSSEAU (E.). — Etude biochimique de la fonte des tumeurs malignes par le Venin de Cobra. *Les Néoplasmes*, t. XII, n° 5, 1933. Paris, Vigot.
80. THIERCELIN et JOUHAUD. — Discipline des Variations de forme de l'Entérocoque. *C. R. Soc. Biol.*, t. LIII, p. 701, 1903.
81. URBAIN (Ach.), GUILLOT (G.) et VALLÉE (M.). — Sur le polymorphisme du Streptocoque gourmeux. *C. R. Soc. Biol.*, t. CIV, p. 42, 1930.
82. VEJDOVSKY (F.). — Ueber den Kern der Bakterien und seine Teilung. *Centralbl. f. Bakter.*, II, t. XII, p. 481, 1904.
83. WAMOSCHER (L.). — Versuche über die Struktur der Bakterienzelle. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. CXI, p. 422, 1930.
84. WASSERZUG. — Variations durables de la forme et de la

fonction chez les Bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*,
t. II, p. 154, 1888.

85. WILSON. — Pleomorphism as exhibited by Bacteria-
grown on media containing urea. *Journ. of Pa-
thol. and Bacteriology*, t. XI, p. 394, 1907.

86. ZOPF. — Zur Morphologie der Spaltpilzen. *Breslau*,
1883.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	5
CHAPITRE PREMIER. — <i>Historique de la variabilité en Bactériologie</i>	9
Action des agents chimiques.....	11
Influence du pH	12
Action des antiseptiques.....	13
Action des agents physiques.....	16
Formes anormales du Streptocoque observées directement sur les malades et dans les hémocultures	17
Phénomènes d'accoutumance.....	20
Formes de la variabilité.....	23
Cytologie bactérienne.....	25
Partisans du noyau vrai.....	25
Partisans du noyau diffus.....	26
CHAPITRE II. — <i>Action des quelques antiseptiques sur la morphologie du Streptocoque</i>	30
Généralités	30
Milieu nutritif.....	31
Streptocoques employés.....	32
Solutions d'antiseptiques.....	33
Technique spéciale pour l'anaérobiose.....	34
Température de culture.....	35
Solution colorante.....	35
Action particulière de chaque antiseptique.....	36
Phénol.....	36
Pyrocatéchine	37
Résorcine.....	38
Hydroquinone	39
Pyrogallol.....	40
Bisulfite de sodium.....	42

Hydrosulfite de sodium.....	43
Sulficétone.....	44
Acide borique.....	45
Novarsénobenzol.....	46
Résumé du chapitre.....	47
Description des formes anormales.....	48
Considérations générales.....	49
CHAPITRE III. — <i>Action de la Lysocithine sur le Streptocoque.</i>	53
Historique de la Lysocithine.....	53
Préparation de la Lysocithine.....	54
Rendement pondéral.....	57
Action biophysique de la Lysocithine (hémolyse).....	57
Action cytolytique de la Lysocithine.....	58
Action de la Lysocithine sur le Streptocoque hypertrophié.	61
Solution de Lysocithine.....	62
Technique.....	62
Action de la Lysocithine de Venin de Cobra sur le	
Streptocoque hypertrophié.....	64
Action de la Lysocithine de Venin de Cobra sur le	
Streptocoque normal.....	66
Action de la Lysocithine de Venin de Vipère sur le	
Streptocoque hypertrophié.....	67
Action de la Lysocithine de Venin de Vipère sur le	
Streptocoque normal.....	69
Détermination du pouvoir bactéricide.....	69
Résumé du chapitre.....	70
CHAPITRE IV. — <i>Considérations sur la cytologie du corps microbien</i>	72
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	75
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.....	78

